

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTREAL

L'OCYTOCINE DANS LA DIFFÉRENCIATION CARDIOMYOGÉNIQUE ET ADIPOGÉNIQUE
DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES P19

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
FRÉDÉRIC BOUCHARD

MARS 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Nous devons faire attention de ne pas faire
de l'intellect notre dieu ;
Il a, bien sûr, des muscles puissants, mais pas
de personnalité.
Il ne peut pas commander ; seulement servir.*
Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier ma directrice de recherche la Dre Joanne Paquin pour son soutien, sa confiance et sa patience tout au long de ces deux années de maîtrise.

Une maîtrise est un apprentissage constant, c'est pourquoi j'aimerais remercier les Drs Borhane Annabi, Diana Averill et Eric Rassart (Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada) pour leur soutien technique, le partage de leur appareillage ainsi que leurs connaissances dans les domaines de cytométrie de flux, microscopie à fluorescence et PCR respectivement. Un merci tout particulier au Dr Antony Pilorget (étudiant gradué de l'Université du Québec à Montréal) pour son expertise scientifique et technique lors de la mise au point de plusieurs méthodes expérimentales non établies dans le laboratoire.

L'ambiance qui règne dans un laboratoire est souvent le reflet des personnes qui y travaillent. Durant ces deux années, j'ai tout particulièrement apprécié la présence de mes collègues Philippe Ducharme et Josianne Gagné pour leur discussion, leur soutien et leur précieux conseils. Je remercie aussi les Drs Bogdan A. Danalache et Marion Maire.

Un merci spécial va aux membres de ma famille, Raynald, Jeanne et Lysianne, qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes objectifs et qui m'ont soutenu tout au long de mes études post-graduées. Aujourd'hui, je suis fier de partager avec eux le fruit de tous ces efforts puisque c'est en partie grâce à eux que j'ai pu me rendre jusqu'ici. J'exprime aussi ma reconnaissance à Catherine, ma copine de vie, pour ses encouragements constants et chaleureux et pour nos discussions scientifiques.

Finalement, je remercie les IRSC pour leur soutien financier, sans lequel cette étude n'aurait pu être réalisée. La participation à la 48^e réunion annuelle du Club de Recherche Cliniques du Québec fut en parti subventionnée par une bourse au déplacement de la faculté des sciences.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	xi
 CHAPITRE I: INTRODUCTION	 1
1.1 Les maladies cardiovasculaires	1
1.1.1 Aspects généraux	1
1.1.2 Les thérapies non cellulaires actuelles	1
1.1.3 Les thérapies cellulaires.....	1
1.2 Les cellules souches	3
1.2.1 Définition et types.....	3
1.2.2 Cellules souches embryonnaires et feuillets germinatifs	3
1.2.3 Cellules souches somatiques.....	4
1.3 Différenciation <i>in vitro</i> de cellules souches.....	5
1.3.1 Cellules souches embryonnaires	5
1.3.2 Cellules souches somatiques.....	5
1.4 Voies cardiomyogéniques et adipogéniques.....	9
1.4.1 Facteurs cardiomyogéniques.....	9
1.4.2 Facteurs adipogéniques.....	9
1.4.3 Points communs entre les cardiomyocytes et les adipocytes	11
1.5 Le modèle P19 de cellules souches embryonnaires.....	15
1.5.1 Introduction.....	15
1.5.2 Différenciation des cellules souches embryonnaires P19	16
1.6 L'ocytocine (OT) comme agent de différenciation	17
1.6.1 Structure de l'OT	17
1.6.2 Sites et étapes de synthèse	17
1.6.3 Différents rôles et mécanismes d'action	18
1.6.4 Rôle de l'OT dans l'homéostasie cardiovasculaire et la différenciation cardiaque	20
1.7 Présentation de quelques marqueurs phénotypiques	20
1.8 Hypothèse et objectifs spécifiques	23

CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES	25
2.1 Culture et différenciation des cellules P19	25
2.1.1 Culture des cellules P19 indifférenciées	25
2.1.2 Protocole cardiomyogénique « classique »	25
2.1.3 Protocole cardiomyogénique « classique » avec incorporation de gouttes pendantes	26
2.1.4 Protocole adipogénique.....	26
2.1.5 Protocole ostéogénique	27
2.2 Culture et différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (MSC)	27
2.2.1 Préparation des MSC	27
2.2.2 Culture des MSC indifférenciées	28
2.2.3 Différenciation des MSC en adipocytes.....	28
2.2.4 Différenciation des MSC en ostéocytes	28
2.3 Histochimie	29
2.3.1 Quantification relative des cellules au cristal violet.....	29
2.3.2 Analyse des adipocytes par l'Oil-Red-O	29
2.3.3 Analyse des ostéocytes via la phosphatase alcaline	29
2.4 Rétrotranscription et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)	30
2.4.1 Extraction de l'ARN	30
2.4.2 Rétrotranscription (RT).....	31
2.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	31
2.5 Immunoprécipitation et immunodétection de type Western.....	32
2.5.1 Extraction des protéines cellulaires et immunoprécipitation	32
2.5.2 Dosage des protéines	33
2.5.3 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	33
2.5.4 Électrotransfert en mode semi-sec	33
2.5.5 Immunobuvardage	34
2.6 Analyse immunologique de SSEA-1	34
2.6.1 Immunocytofluorescence indirecte en microscopie.....	34
2.6.2 Analyse de SSEA-1 au cytomètre de flux.....	35
2.6.3 Rétention immunomagnétique de cellules P19 SSEA-1-positives.....	35
2.7 Analyse statistique.....	36
CHAPITRE III: RÉSULTATS.....	37
3.1 Génération d'adipocytes à partir de cellules P19	37

3.1.1 Génération d'adipocytes en absence et en présence d'OT	37
3.1.2 Analyse de PPAR γ et aP2 dans les cultures P19 soumises au protocole adipogénique	40
3.1.3 Génération d'adipocytes à partir des cellules souches adultes (MSC).....	43
3.2 Les cellules P19 génèrent des cardiomyocytes lorsque traitées avec l'AR, l'Ins et T3	43
3.2.1 Présence de cellules battantes dans la différenciation adipogénique	43
3.2.2 Expression des marqueurs cardiaques GATA4 et TpnI cardiaque dans le protocole adipogénique	45
3.3 Différenciation des cellules P19 en ostéocytes	49
3.3.1 Génération d'ostéocytes P19.....	49
3.3.2 Génération de cardiomyocytes et d'adipocytes dans les cultures d'ostéocytes P19	49
3.4 Rendement cardiomyogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques	52
3.4.1 Génération de cellules battantes.....	52
3.4.2 Analyse par RT-PCR de la TpnI cardiaque	55
3.5 Rendement adipogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques.....	57
3.6 Études exploratoires de l'expression de l'antigène de l'état non-différencié SSEA-1	60
3.6.1 Expression de SSEA-1 par les cultures P19 indifférenciées.....	60
3.6.2 Expression de SSEA-1 par les agrégats	61
CHAPITRE IV: DISCUSSION.....	64
4.1 Génération d'adipocytes.....	65
4.2 Génération de cardiomyocytes avec les traitements adipogéniques	68
4.3 Comparaison du rendement cardiomyogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques	70
4.4 Comparaison du rendement adipogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques...	72
4.5 Isolation des cardiomyocytes dans les cultures	73
CONCLUSION	74
Appendice A.....	75
Appendice B	76
BIBLIOGRAPHIE	77
CD-ROM	

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Génération, culture et différenciation de cellules souches embryonnaires	4
1.2 Culture et différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC)	7
1.3 Les différents modèles <i>in vitro</i> pour étudier la différenciation en adipocytes	11
1.4 Rôle des Rho GTPases dans la différenciation adipogénique et cardiomyogénique	12
1.5 Signalisation médiant le transport du glucose stimulé par l'insuline	13
1.6 Facteurs médiant la régulation du transport du glucose par la contraction musculaire	14
1.7 Le modèle cellulaire P19	16
1.8 Structure primaire de l'ocytocine et la vasopressine	17
1.9 Biosynthèse de OT à partir de sa forme pro-OT	18
1.10 Implication du Ca^{2+} dans la conformation de la troponine cardiaque	22
2.1 Schéma temporel du protocole cardiomyogénique « classique » sans et avec incorporation de gouttes pendantes	26
2.2 Schéma temporel du protocole adipogénique	27
3.1 Différenciation adipogénique des cellules P19 en absence et présence d'OT	38
3.2 Expression de PPAR γ dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes	41
3.3 Expression d'aP2 dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes	42
3.4 Différenciation des MSC en adipocytes	44
3.5 Expression de GATA4 dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes	46
3.6 Expression de la TpnI cardiaque dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes	48
3.7 Différenciation des cellules P19 en ostéocytes	50
3.8 Présence d'autres types cellulaires dans les cultures de cellules P19 différenciées en ostéocytes ..	51
3.9 Profil temporel de l'apparition de cellules battantes dans les protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques	53
3.10 Comparaison de l'expression génique de la TpnI cardiaque dans les protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques	56
3.11 Immunodétection de la TpnI dans les cultures P19	58
3.12 Rendement adipogénique des différenciations des cellules P19	59
3.13 Expression du marqueur de non-différenciation SSEA-1 par les cellules P19 indifférenciées	62
3.14 Analyse de SSEA-1 par FACS	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples de types cellulaires générés par la différenciation <i>in vitro</i> de cellules souches embryonnaires ou leurs équivalentes	6
1.2 Caractérisation phénotypique des cellules souches mésenchymateuses	8
2.1 Séquence des amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR	32
3.1 Rendements cardiomyogéniques de différents protocoles adipogéniques	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i> (peptide natriurétique auriculaire)
AR	acide rétinoïque
ARN	acide ribonucléique
AzaC	5-azacytidine
BCA	acide bicinchoninique
BMP-2	<i>bone morphogenic protein-2</i> (protéine morphogénique-2 de l'os)
BSA	<i>bovin serum albumin</i> (albumine sérique bovine)
DAG	1,2-diacylglycérol
CE	carcinome embryonnaire
DEPC	diéthylpyrocarbonate
Dex	dexaméthasone
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (modification Dulbecco du milieu d'Eagle)
DMEMC	DMEM complet (i.e. contenant du sérum)
DMSO	diméthylsulfoxyde
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (kinase régulée par des signaux extracellulaires)
FABP	<i>fatty acid binding protein</i> (protéine de liaison d'acides gras)
FGF-4	<i>fibroblast growth factor-4</i> (facteur de croissance fibroblastique-4)
IBMX	isobutyl-méthyl-xanthine
Ins	insuline
IP3	inositol-1,4,5-triphosphate
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i> (facteur inhibiteur de la leucémie)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (protéine-kinase activée par des mitogènes)
MCD	milieu complet de différenciation
MCP	milieu complet de propagation
MEM	milieu essentiel minimal
MHC	<i>myosin heavy chain</i> (chaîne lourde de la myosine)
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> (cellule souche mésenchymateuse)
ND	non différencié
NI	non induit
NO	oxyde nitrique
NP-I	neurophysine-I
OT	ocytocine
OTA	antagoniste du récepteur de l'ocytocine
OTR	récepteur de l'ocytocine
PA	phosphatase alcaline
PBS	tampon phosphate salin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PLC	phospholipase C
pNP	para-nitrophénol
pNPP	para-nitrophénylphosphate
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes)
PVDF	polyvinylidène difluoré
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque
RE	réticulum endoplasmique
RIPA	tampon de lyse cellulaire
RT	rétrotranscription
SDS	dodécylsulfate de sodium

SNAP	S-nitroso-N-acétylpénicillamine
SSEA-1	<i>stage specific embryonic antigen-1</i> (antigène embryonnaire spécifique de stage-1)
T3	triiodothyronine
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (tampon Tris salin)
TE	tampon d'échantillon
TpnI	troponine I
VP	vasopressine

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Les gens ayant survécu à un ou des infarctus du myocarde voient leur qualité de vie fortement diminuée. Afin de redonner une certaine qualité de vie à ces gens, les thérapies établies vont de la prise de médicaments à la transplantation de l'organe entier, une chirurgie reliée à un taux de morbidité élevée. Dans le but de diminuer cette morbidité et mortalité, comme de pallier la difficulté d'approvisionnement en organes, les thérapies cellulaires voient le jour. Ces thérapies impliquent l'injection de cellules souches embryonnaires ou adultes non différenciées ou différenciées en cardiomyocytes. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse constituent un type de cellules souches adultes qui suscite un grand intérêt parce qu'elles permettent les autogreffes et qu'elles peuvent être obtenues par des méthodes de prélèvement établies. L'injection de MSC indifférenciées dans la circulation systémique après un infarctus du myocarde a montré qu'un petit nombre de cellules s'implantaient dans la partie nécrosée du cœur. Pour augmenter le recouvrement fonctionnel de l'organe, les chercheurs envisagent l'implantation de cellules différenciées en cardiomyocytes. La difficulté de cette approche est le faible rendement de différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes. Des travaux antérieurs faits dans notre laboratoire ont montré que l'hormone peptidique ocytocine (OT) a des propriétés cardiomyogéniques dans le modèle P19 de carcinome embryonnaire de souris, un modèle établi de cellules souches embryonnaires.

Les cardiomyocytes sont dérivés du mésoderme. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les inducteurs d'autres dérivés mésodermiques, en particulier les inducteurs adipogéniques, pouvaient être associés à l'OT pour augmenter le rendement cardiomyogénique. Les cellules P19 se différencient en adipocytes et le protocole adipogénique implique une induction avec 1 μ M d'acide rétinoïque (AR) durant la période d'agrégation (phase précoce de la différenciation) et exposition à 85 nM d'insuline (Ins) et 2 nM de l'hormone thyroïdienne T3 lors de la période post-agrégation (phase tardive de la différenciation). La génération d'adipocytes a été révélée par coloration des lipides avec l'Oil-Red-O et l'augmentation de l'expression génique de PPAR γ et aP2 par PCR. L'ajout de 10⁻⁷M d'OT dans la phase tardive diminue de 60% la coloration à l'Oil-Red-O. Une diminution de l'ARNm de PPAR γ est aussi notée, indiquant une inhibition de l'adipogénèse et non une simple réduction de la production de lipides par l'OT. Des études préliminaires montrent que l'OT inhibe aussi partiellement la différenciation des cellules P19 en ostéocytes et la différenciation des MSC de la moelle osseuse en adipocytes.

Le protocole adipogénique, permet aussi de générer des colonies de cellules battantes organisées en myofibres dans les cultures P19, lesquelles expriment les ARNm de GATA4 et de la troponine I (TpnI) cardiaque. L'ajout d'OT à l'Ins et T3 dans la différenciation adipogénique induit une augmentation des ARNm de GATA4 et de la TpnI cardiaque. L'OT favoriserait donc la cardiomyogénèse sur l'adipogénèse dans les conditions adipogéniques. Cependant, il semble que cette influence de l'OT ne serait perceptible que si le sérum de culture est préalablement inactivé à la chaleur. L'ajout d'OT à l'AR inhibe à la fois la génération de cardiomyocytes et d'adipocytes. Les colonies battantes n'ont pas la même forme dans le protocole adipogénique et cardiomyogénique des P19. La différenciation adipogénique génère des colonies arrangées en fibres alors que la différenciation cardiomyogénique (utilisant l'OT dans l'agrégation et aucun agent de maturation post-agrégation) génère des colonies en îlots arrondis. D'autre part, une plus longue exposition à l'OT dans le protocole cardiomyogénique augmente d'environ deux fois le rendement en cardiomyocytes selon les niveaux d'ARNm de la TpnI cardiaque. Parmi les protocoles testés, c'est ce dernier qui donne le meilleur rendement en cardiomyocytes.

Compte tenu que des travaux ont rapporté une expression de l'OT ou de son récepteur dans des structures pré-embryonnaires ou embryonnaires précoces, l'ensemble des résultats suggèrent un rôle possible de l'hormone dans la régulation de la différenciation mésodermique.

L'OT fut démontrée comme étant cardiomyogénique dans les cellules P19 lorsqu'utilisée comme agent inducteur durant la période d'agrégation. Dans cette étude, le maintien de l'OT durant la période post-agrégation augmente le rendement cardiomyogénique. Parmi les protocoles testés c'est celui qui donne le meilleur rendement en cardiomyocytes.

Mots-clés : Cardiomyocytes, myofibres, adipocytes, cellules P19, cellules souches embryonnaires, cellules souches mésenchymateuses (MSC)

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les maladies cardiovasculaires

1.1.1 Aspects généraux

L'infarctus du myocarde sont une des premières causes de mortalité au Canada (Statistique Canada; <http://www.statcan.ca/>). Cela signifie des dépenses directes de plus de 7 milliards de dollars et indirectes de 12 milliards pour les contribuables canadiens (Santé Canada; <http://www.statcan.ca/>). Les infarctus du myocarde ne sont qu'un exemple de maladies cardiovasculaires qui comptent aussi d'autres causes comme l'insuffisance cardiaque et les problèmes de conduction électrique comme la bradycardie ou la tachycardie.

1.1.2 Les thérapies non cellulaires actuelles

Les patients qui survivent à une première attaque cardiaque voient leur qualité de vie fortement diminuée. À l'heure actuelle, les thérapies cardiovasculaires vont de la prise de médicaments jusqu'à la transplantation de l'organe en entier selon l'état du patient. Afin de diminuer les effets secondaires de l'infarctus du myocarde plusieurs thérapies existent. Dans le cas de problème de conduction électrique du cœur, la prise de médicaments peut régulariser le rythme des battements (Fugate, 2006). Afin de contrer les effets de l'insuffisance cardiaque, un stimulateur peut être greffé au cœur du patient (Allen, 2006). Dans le cas d'une perte importante de la fonction cardiaque due à une nécrose étendue du cœur suivant un infarctus du myocarde, la seule solution possible est la transplantation d'un organe entier et il s'agit ici d'une chirurgie reliée à un taux élevé de morbidité (Zimmermann *et al.*, 2006).

1.1.3 Les thérapies cellulaires

Depuis quelques années, la médecine cardiovasculaire se tourne vers les thérapies cellulaires afin de soigner les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, qui ne répondent pas aux traitements par médicaments et ceux présentant des lésions locales du myocarde. Cette avenue prévoit l'implantation de cellules dans le myocarde afin de remplacer en cellules les zones nécrosées. Plusieurs types cellulaires sont considérés et certains analysés dans le but de réduire la perte de fonction cardiaque chez le patient. En premier lieu, des cardiomyocytes néonataux de souris ont été implantés chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde (Koh *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1995) et il fut remarqué une augmentation de la fonction cardiaque. L'implantation de cardiomyocytes de nouveaux-nés ne peut malheureusement être appliquée à l'humain dû à des problèmes évidents d'éthique. Ces résultats ont

tout de même donné l'idée à certains chercheurs d'explorer l'implantation des cellules satellites de muscle squelettique dans la partie nécrosée du cœur du patient (Taylor *et al.*, 1998; Kessler et Byrne, 1999). Les résultats ont montré une amélioration de l'activité cardiaque. Cette approche a été jugée prometteuse, par la possibilité d'autogreffe ce qui diminuerait le risque de rejet cellulaire. Par contre, les myocytes squelettiques, bien que contractiles, ne s'incorporent pas fonctionnellement au muscle cardiaque.

Des cellules souches embryonnaires animales et humaines qui peuvent être pré-différenciées *in vitro* en cardiomyocytes sont aussi considérées comme matériel de greffe (Wobus *et al.*, 1997; Doevendans *et al.*, 2000; Kehat *et al.*, 2001; Boheler *et al.*, 2002). Cependant, la différenciation cardiomyogénique est encore peu efficace *in vitro*. De plus, dans le cas des cellules souches embryonnaires, les cellules demeurent non-différenciées peuvent générer des tumeurs de type tératocarcinome. D'autre part, l'implantation de cellules souches embryonnaires humaines présente des problèmes d'éthique et l'implantation de cellules souches animales chez l'humain est associée à un risque de rejet. Pour éviter le rejet cellulaire, certains chercheurs se sont tournés vers les cellules souches adultes tant de la moelle osseuse que sanguines isolées à même l'individu ayant subi un infarctus du myocarde (Ringe *et al.*, 2002). Les résultats d'implantation de telles cellules ont montré une récupération au moins partielle de la fonction cardiaque chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde (Wang *et al.*, 2000; Ringe *et al.*, 2002). L'utilisation de souris a permis de démontrer que l'injection de cellules souches mésenchymateuses (MSC) dans la circulation systémique de l'animal artificiellement infarcté améliorait la fonction cardiaque (Piersma *et al.*, 1983). De même, si l'injection de MSC est faite dans le myocarde à proximité de l'endroit où a eu lieu l'infarctus, il est possible d'observer la présence des MSC dans la partie nécrosée, 9 jours post-implantation (Orlic *et al.*, 2001). Le nombre de cellules souches adultes s'implantant dans le cœur demeure tout de même faible. Une portion de celles qui s'implantent peut se différencier en cellules endothéliales et d'autres expriment des marqueurs cardiaques (Kobayashi *et al.*, 2000; Kamihata *et al.*, 2001; Kawamoto *et al.*, 2001). La différenciation endothéliale est vue comme une stratégie perfectionnée parce que favorable à une revascularisation de la zone nécrosée. D'autres chercheurs tentent d'implanter des cellules souches adultes pré-dérivées en cardiomyocytes mais, comme pour les cellules souches embryonnaires, le rendement de différenciation est très faible (Makino *et al.*, 1999; Toma *et al.*, 2002). Les conditions de différenciation *in vitro* des cellules souches adultes en cellules endothéliales restent encore à définir, mais il se pourrait que l'hypoxie locale qui résulte de l'infarctus puisse contribuer à induire cette différenciation. En effet, la culture en hypoxie de MSC sur matrigel induit leur migration pour former une structure tridimensionnelle apparentée à des capillaires (Annabi *et al.*, 2003). La 5-azacytidine

(AzaC), un agent de déméthylation de l'ADN est un inducteur cardiomyogénique souvent utilisé *in vitro* avec des cellules souches adultes à défaut d'en connaître de plus efficaces. Des études cliniques ont déjà montré que les méthodes d'implantation (que ce soit par la voie intracoronarienne, intramyocardique ou transépicaudique) sont réalisables, sécuritaires et montrent une efficacité du rendement de la perfusion du cœur infarci (Strauer *et al.*, 2002; Perin *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2003; Tse *et al.*, 2003; Wollert *et al.*, 2004). Il semble que lorsque les MSC sont injectées dans la circulation sanguine, au moins une proportion d'entre elles migre vers le cœur (Allers *et al.*, 2004).

1.2 Les cellules souches

1.2.1 Définition et types

La définition des cellules souches repose sur deux critères. Elles doivent être multipotentes et être capables de proliférer (Tuch, 2006). Il existe quatre types de cellules souches sur la base de leur potentiel à générer des types cellulaires différenciés : unipotentes, multipotentes, pluripotentes et totipotentes. Les cellules unipotentes ne peuvent former qu'une sorte de cellules différenciées. Les cellules multipotentes sont à l'origine d'au moins deux types de cellules différenciées, le plus souvent reliés à l'un ou l'autre des trois feuillets germinatifs. Dans la catégorie des cellules multipotentes, sont retrouvées les cellules souches de la moelle osseuse, soient les cellules hématopoïétiques (donnant les différents types de cellules sanguines) et les cellules mésenchymateuses (donnant principalement les adipocytes, ostéocytes et chondrocytes). Les cellules totipotentes sont les cellules formant l'embryon dans les tous premiers jours de son développement ; elles génèrent tous les types cellulaires menant à la formation d'un organisme complet. Les cellules souches embryonnaires peuvent être cultivées *in vitro* et donner naissance à différents types cellulaires mais comme on ne connaît pas les conditions menant à tous les types cellulaires, elles sont dites pluripotentes.

1.2.2 Cellules souches embryonnaires et feuillets germinatifs

Les cellules souches de l'embryon s'organisent d'abord en deux couches, soient l'ectoderme, superficiellement et l'endoderme, plus profondément. Entre ces deux couches, apparaît ensuite une troisième couche, le mésoderme. Ces trois couches ou feuillets vont constituer l'ébauche de tous les tissus et organes de l'organisme. L'ectoderme donne naissance à la peau et au système nerveux, le mésoderme génère le tissu conjonctif, le squelette, le tissu adipeux et les muscles et enfin, l'endoderme est responsable de la formation de l'appareil digestif et du parenchyme de diverses glandes (foie, pancréas, surrénales, poumons). (Le Moigne et Foucher, 2001)

Les cellules souches embryonnaires répondent parfaitement à la définition de cellules souches, puisqu'elles sont capables de division infinie et peuvent être différenciées *in vivo* comme *in vitro* en cellules de plusieurs tissus de l'organisme. Une différenciation contrôlée des cellules souches embryonnaires *in vitro* passe le plus souvent par la production de corps embryoides, des agrégats sphériques multicellulaires proposant un environnement similaire à celui de l'embryon. Par la suite, les corps embryoides sont cultivés en couches adhérentes à un support de culture pour y observer les cellules différenciées (voir figure 1.1). Des agents inducteurs sont utilisés durant la phase de formation des corps embryoides et/ou durant la phase d'adhésion.

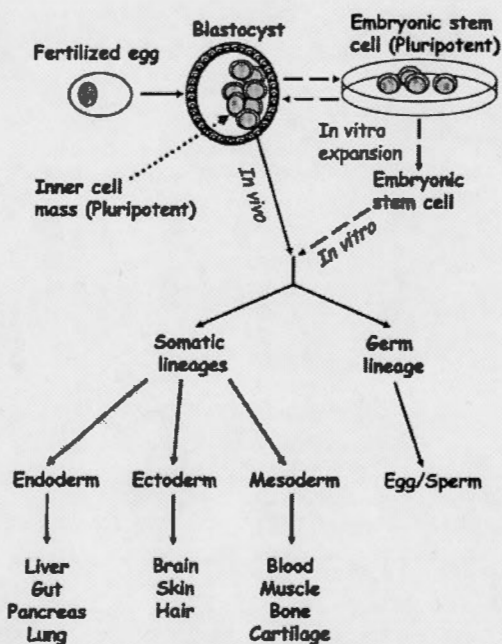


Figure 1.1 Génération, culture et différenciation de cellules souches embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires sont isolées de la masse interne du blastocyste. Si elles sont injectées dans un autre blastocyste qui se développe *in vivo* (*in utero*), les cellules souches embryonnaires contribuent à la génération des différents feuillets embryonnaires de l'organisme entier ainsi qu'à celle des cellules germinales. Lorsque les cellules du blastocyste sont mises en culture *in vitro*, il est possible de les multiplier et de les induire à se différencier en différents types cellulaires. La différenciation nécessite souvent la formation de corps embryoides. (Ulloa-Montoya *et al.*, 2005)

1.2.3 Cellules souches somatiques

En permettant les autogreffes, les cellules souches adultes (somatiques) permettent de contourner les problèmes de rejet associés à des allogreffes, en plus d'éviter les problèmes éthiques reliés à l'utilisation de cellules souches embryonnaires. Aussi de nombreux travaux se penchent présentement sur les conditions de différenciations de ces cellules *in vitro*. Des cellules souches adultes sont

retrouvées dans plusieurs sinon la quasi-totalité des organes qui composent le corps humain (Baksh *et al.*, 2004). Parmi les organes les plus utilisés comme source de cellules souches, on compte la moelle osseuse, le muscle squelettique ainsi que les masses graisseuses, endroits où l'extraction des cellules est la plus facile. La moelle osseuse permet d'obtenir deux types de cellules souches, les cellules hématopoïétiques (précurseurs des cellules sanguines) et les cellules mésenchymateuses qui vont se différencier plus facilement en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes, mais qui peuvent aussi être différenciées en neurones et en cardiomyocytes. Les cellules souches adultes sont multipotentes, elles peuvent se différencier en phénotypes cellulaires spécifiques du tissu où elles nichent. Elles permettraient la réparation et/ou régénération du tissu endommagé. Nous pouvons imaginer que si les cellules souches somatiques sont sorties de leur « niche » naturelle, leur spectre de différenciation pourrait être augmenté et que si elles sont mises en présence d'agent favorisant un type cellulaire particulier, elles pourraient se différencier en un type cellulaire totalement différent de ceux retrouvés dans le tissu niche.

1.3 Différenciation *in vitro* de cellules souches

1.3.1 Cellules souches embryonnaires

Il y a une abondante littérature en ce qui a trait à la détermination des conditions capables d'induire la différenciation des cellules souches embryonnaires *in vitro*. Des travaux rapportent ainsi une différenciation en cellules des trois feuillets embryonnaires (Keller, 2005; Moon *et al.*, 2006) comme le montre le tableau 1.1.

1.3.2 Cellules souches somatiques

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse sont parmi les cellules souches somatiques les plus étudiées. Ces cellules peuvent être isolées, multipliées en culture (Bruder *et al.*, 1997) et différenciées en cellules osseuses (Jaiswal *et al.*, 1997), de cartilage (Johnstone *et al.*, 1998), de muscle (Wakitani *et al.*, 1995), de gras (Pittenger *et al.*, 1999) et de bien d'autres tissus comme le montre la figure 1.2. Ces cellules sont isolées de la moelle osseuse extraite de fémurs, tibias ou os iliaques (Caplan, 1991). Les MSC se différencient en adipocytes, ostéocytes et chondrocytes en culture en plus d'exprimer ou non certains marqueurs phénotypiques comme le montre le tableau 1.2 (Deans et Moseley, 2000). Des cellules souches adultes capables de différenciation peuvent aussi être isolées de différents tissus de l'organisme. Par exemple, des cellules souches provenant de la masse graisseuse abdominale peuvent être différenciées en cardiomyocytes (Gaustad *et al.*, 2004), des cellules souches neuronales peuvent générer des cardiomyocytes en présence d'insuline (Bani-

Yaghoub *et al.*, 2004) et les cellules souches de la peau peuvent quant à elles, être différenciées en neurones (Toma *et al.*, 2001).

Tableau 1.1 Exemples de types cellulaires générés par la différenciation *in vitro* de cellules souches embryonnaires ou leurs équivalentes*.

Types cellulaires générés	Conditions de différenciation**	Référence
Neurones	MAS + AR / MSS	(Edwards et McBurney, 1983; Bain <i>et al.</i> , 1995; Okabe <i>et al.</i> , 1996)
Cardiomyocytes	MAS + DMSO / MAS MAS + T3 / MAS MAS / MAS MAS + Dynorphine / MAS MAS + Ocytocine / MAS MAS + acide ascorbique / MAS MAS + 5-Azacytidine / MAS	(Rudnicki et McBurney, 1987) (Rodriguez <i>et al.</i> , 1994) (Hescheler <i>et al.</i> , 1997) (Ventura et Maioli, 2000) (Paquin <i>et al.</i> , 2002) (Takahashi <i>et al.</i> , 2003) (Choi <i>et al.</i> , 2004)
Squelettomyocytes	MAS + DMSO / MAS MAS / MAS	(Rudnicki et McBurney, 1987) (Rohwedel <i>et al.</i> , 1994)
Ostéocytes	MAS + AR / MAS + acide ascorbique, β -glycérophosphate et Dex MAS + AR / MAS + acide ascorbique, β -glycérophosphate et vitamine D	(Buttery <i>et al.</i> , 2001) (zur Nieden <i>et al.</i> , 2003)
Chondrocytes	MAS + BMP-2 et/ou BMP-4 / MAS	(Kramer <i>et al.</i> , 2000)
Adipocytes	MAS + AR / MAS + Ins, T3	(Dani <i>et al.</i> , 1997)
Ilots pancréatiques	MAS / MSS + FGF	(Lumelsky <i>et al.</i> , 2001)
Hépatocytes	MAS / MAS + FGF, HGF, Oncostatine M, Dex, Ins, Transferrine	(Hamazaki <i>et al.</i> , 2001)

* Les cellules de carcinomes embryonnaires sont des cellules modèles de cellules souches embryonnaires. La lignée P19 en est un exemple qui sera présenté plus en détail à la section 1.5.

** Conditions de la première étape / conditions de la deuxième étape. La différenciation est souvent réalisée en deux étapes où la première étape implique la culture des cellules sous forme de corps embryoïdes en suspension, et la deuxième, sous forme de couches adhérentes. MAS : Milieu Avec Sérum, MSS : Milieu Sans Sérum, AR : Acide Rétinoïque, DMSO : Diméthylsulfoxyde, T3 : hormone thyroïdienne T3, Dex : Dexaméthasone, Ins : Insuline, FGF : *Fibroblast Growth Factor*, HGF : *Hepatocyte Growth Factor*, BMP-2,4 : *bone morphogenic protein-2,4*.

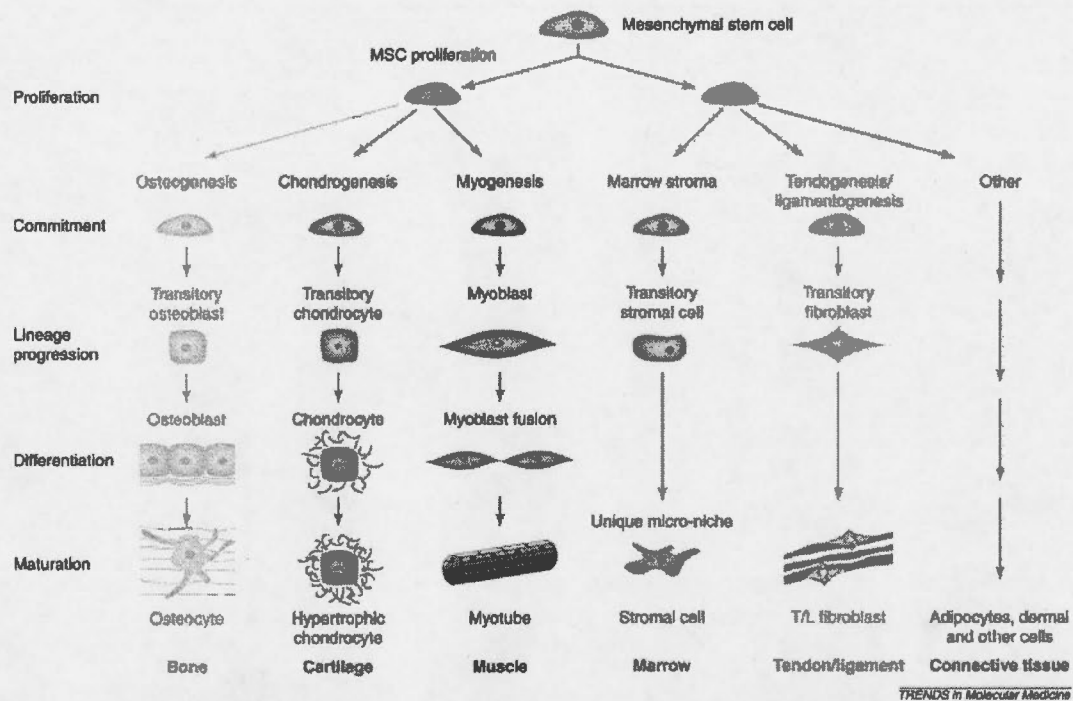


Figure 1.2 Culture et différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les MSC sont un modèle de cellules souches adultes multipotentes. Elles sont indifférenciées, capables de prolifération et, lorsqu'elles sont exposées à des agents promoteurs de différenciation, elles peuvent être différenciées en cellules de plusieurs types tissulaires. (Caplan et Bruder, 2001)

Tableau 1.2 Caractérisation phénotypique des cellules souches mésenchymateuses (Deans et Moseley, 2000).

Common name	CD locus	Detection
Adhesion molecules*		
ALCAM	CD166	Pos
ICAM-1	CD54	Pos
ICAM-2	CD102	Pos
ICAM-3	CD50	Pos
E-selectin	CD62E	Neg
L-selectin	CD62L	Pos
P-selectin	CD62P	Neg
LFA-3	CD58	Pos
Cadherin 5	CD144	Neg
PECAM-1	CD31	Neg
NCAM	CD56	Pos
HCAM	CD44	Pos
VCAM	CD106	Pos
Hyaluronate receptor	CD44	Pos
Growth factors and cytokine receptors*		
IL-1R (α and β)	CD121a,b	Pos
IL-2R	CD25	Neg
IL-3R	CD123	Pos
IL-4R	CD124	Pos
IL-6R	CD126	Pos
IL-7R	CD127	Pos
Interferon γ R	CDw119	Pos
TNF- α -1R	CD120a	Pos
TNF- α -2R	CD120b	Pos
FGFR		Pos
PDGFR	CD140a	Pos
Transferrin receptor	CD71	Pos
Integrins*		
VLA- α 1	CD49a	Pos
VLA- α 2	CD49b	Pos
VLA- α 3	CD49c	Pos
VLA- α 4	CD49d	Neg
VLA- α 5	CD49e	Pos
VLA- α 6	CD49f	Pos
VLA- β chain	CD29	Pos
β_2 integrin	CD104	Pos
LFA-1 α chain	CD11a	Neg
LFA-1 β chain	CD18	Neg
Vitronectin R α chain	CD51	Neg
Vitronectin R β chain	CD61	Pos
CR4 α chain	CD11c	Neg
Mac1	CD11b	Neg
Additional markers*		
T6	CD1a	Neg
CD3 complex	CD3	Neg
T4, T8	CD4, CD8	Neg
Tetraspan	CD9	Pos
LPS receptor	CD14	Neg
LewisX	CD15	Neg
—	CD34	Neg
Leukocyte common antigen	CD45	Neg
5' terminal nucleotidase	CD73	Pos
B7-1	CD80	Neg
HB-15	CD83	Neg
B7-2	CD86	Neg
Thy-1	CD90	Pos
Endoglin	CD105	Pos
MUC18	CD146	Pos
BST-1	CD157	Pos

1.4 Voies cardiomyogéniques et adipogéniques

1.4.1 Facteurs cardiomyogéniques

Les mécanismes responsables de la différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules musculaires demeurent encore incomplètement compris. Des études réalisées sur des cellules souches de type embryonnaire P19 suggèrent un rôle pour le calcium. En effet, le diméthylsulfoxyde (DMSO) provoque une augmentation temporaire de 5 min du calcium intracellulaire (Morley et Whitfield, 1993) avant d'induire l'expression des facteurs de transcription cardiomyogéniques GATA-4, Nkx-2,5 et MEF2C et celle d'un peptide hormonal cardiaque, l'ANF (Boer, 1994). Wobus et ses collaborateurs ont montré par des études de patch-clamp que les cardiomyocytes obtenus à partir des cellules P19 ressemblent aux cellules cardiaques embryonnaires (Wobus *et al.*, 1994) de différents phénotypes : cellules de Purkinje, cellules *pace-maker* et cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires.

Le DMSO est un agent puissant pour la différenciation des cellules souches embryonnaires et de carcinomes embryonnaires (CE) en cardiomyocytes, mais il n'est pas physiologique. Parmi les substances physiologiques connues on compte l'hormone thyroïdienne T3 à une concentration de 30 nM (Rodriguez *et al.*, 1994), l'acide ascorbique à une concentration de 10^{-4} M (Takahashi *et al.*, 2003), l'oxyde nitrique (NO) généré artificiellement par la S-nitroso-N-acétylpénicillamine (SNAP) à une concentration de 200 μ M (Kanno *et al.*, 2004) et la dynorphine B à une concentration de 1 μ M (Ventura et Maioli, 2000). La 5-azacytidine (AzaC), un agent de déméthylation non physiologique de l'ADN, est aussi cardiomyogénique à une concentration de 1 μ M (Choi *et al.*, 2004). En 2002, l'équipe du Dr Paquin et ses collaborateurs montra que l'ocytocine (OT), lorsqu'utilisée à une concentration de 10^{-7} M, induisait la différenciation de cellules P19 en cardiomyocytes. Ce travail démontra que l'OT permettait l'obtention de cardiomyocytes dans les cultures plus rapidement que le DMSO (Paquin *et al.*, 2002). Pour ce qui est des cellules souches adultes, très peu de conditions sont connues pour induire la cardiomyogenèse. L'AzaC fut le premier agent cardiomyogénique identifié pour agir sur des MSC de la moelle osseuse (Wakitani *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2004). La combinaison de BMP-2 avec FGF-4 s'est aussi révélée être cardiomyogénique (Yoon *et al.*, 2005). Outre des substances, le contact cellule-cellule s'avère aussi être une condition permettant l'obtention de cellules myogéniques (Wang *et al.*, 2006).

1.4.2 Facteurs adipogéniques

La différenciation des cellules souches en adipocytes comprend deux étapes, la génération de préadipocytes et la maturation adipogénique. La lignée fibroblastique 3T3 est une lignée de pré-adipocytes (Green et Meuth, 1974; Green et Kehinde, 1975) qui, lorsque mis en présence d'insuline

(Ins) et d'indométhacine (Chang et Polakis, 1978) ou d'isobutyl-méthyl-xanthine (IBMX) (Russell et Ho, 1976), peuvent générer des adipocytes matures. En 1979, il fut montré que l'incubation de cellules souches du mésoderme (cellules 10T1/2) avec de l'AzaC permettait d'obtenir des adipocytes, mais aussi des myocytes et des chondrocytes (Taylor et Jones, 1979). L'effet adipogénique et myogénique de l'AzaC fut aussi démontré sur des MSC par l'équipe du Dr Caplan (Wakitani *et al.*, 1995). Plusieurs des études sur l'adipogénèse et l'obésité utilisent des lignées de cellules fibroblastiques comme les 3T3 comme modèles cellulaires. Depuis quelques années, les gens s'intéressent davantage aux MSC pour étudier la différenciation en adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2005). La différenciation adipogénique des MSC est similaire à celle des cellules fibroblastiques puisqu'elle nécessite la présence des mêmes agents soient l'Ins, l'IBMX, le dexaméthasone (Dex) et l'indométhacine (Pittenger *et al.*, 1999; Miki *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2004).

La constatation que des cellules souches embryonnaires pouvaient se différencier en adipocytes *in vitro* date du début des années 1990. Des observations morphologiques ont d'abord montré l'apparition spontanée de cellules d'allure adipocytaire dans les cultures (Field *et al.*, 1992). Puis, en 1997, pour la première fois, une différenciation contrôlée des cellules souches embryonnaires en adipocytes est publiée (Dani *et al.*, 1997). Les cellules souches doivent d'abord être amorcées pour la différenciation, i.e. « commises », avec de l'acide rétinoïque (AR) et, par la suite, traitées avec de l'Ins et de la T3 en absence d'AR comme le montre la figure 1.3. Si l'AR est conservé pendant le traitement à l'Ins et à la T3, il inhibe l'adipogénèse (Murray et Russell, 1980). Au point de vue des mécanismes, la différenciation en adipocyte nécessite tout d'abord la phosphorylation de la MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) lors de l'ajout d'AR (Bost *et al.*, 2002). Afin de permettre la maturation en adipocytes, la MAPK Erk doit être déphosphorylée (Bost *et al.*, 2002; Bost *et al.*, 2005) tout comme la MAPK p38 (Aouadi *et al.*, 2006). Des substances ont été reconnues comme inhibant l'adipogénèse de cellules souches et/ou de fibroblastes, comme des hormones (OT, vasopressine (VP) et ghreline) (Wilson et Hollenberg, 1987; Zhang *et al.*, 2004) et des polyphénols (génistéine, épigallocatechine gallate (EGCG) et capsaïcine) (Harmon et Harp, 2001; Dang *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005). Des conditions telles que l'hypoxie (Yun *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005) ou une haute concentration en calcium extracellulaire (Jensen *et al.*, 2004) inhibent aussi cette voie de différenciation.

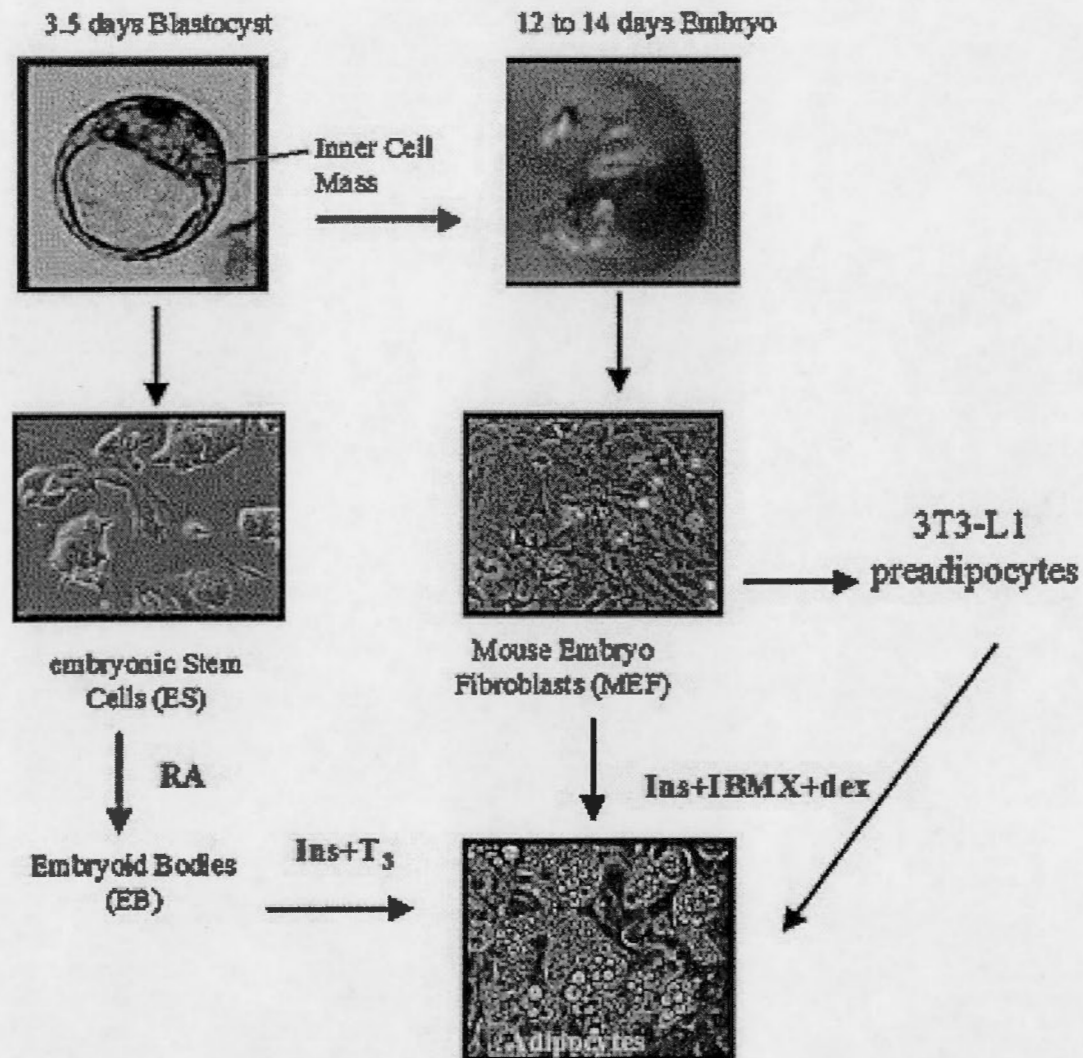


Figure 1.3 Les différents modèles *in vitro* pour étudier la différenciation en adipocytes. Les cellules de la masse interne du blastocyste sont isolées afin d'obtenir des cellules souches embryonnaires (ES) qui sont cultivées sous la forme d'agrégats (EB) en présence d'acide rétinoïque (RA) et ensuite transférées en culture en couches adhérentes en présence d'insuline (Ins) et de l'hormone thyroïdienne T₃ pour obtenir des adipocytes. Alternativement, on laisse l'embryon se développer jusqu'aux jours 12 à 14, puis on en isole les fibroblastes (MEF) qui sont mis en culture en présence d'Ins, de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et de dexaméthasone (dex) pour générer des adipocytes. Des lignées MEF sont immortalisées comme préadipocytes (e.g. 3T3-L1) qui deviennent des adipocytes lorsque traités avec Ins + IBMX + dex. (Bost *et al.*, 2002)

1.4.3 Points communs entre les cardiomyocytes et les adipocytes

Les adipocytes, tout comme les myocytes incluant les cardiomyocytes, dérivent du feuillet embryonnaire mésodermique. On ne connaît pas complètement les mécanismes cellulaires qui influencent la décision des cellules souches de devenir un adipocyte ou un myocyte. Les RhoGTPases

semblent avoir un rôle à jouer dans cette décision. Lorsque l'activité des RhoGTPases est élevée, les cellules souches se différencient en myocytes, mais si elle est réduite sous l'action de la protéine régulatrice p190-B RhoGAP, les cellules souches se différencient plutôt en adipocytes comme le montre la figure 1.4 (Sordella *et al.*, 2003).

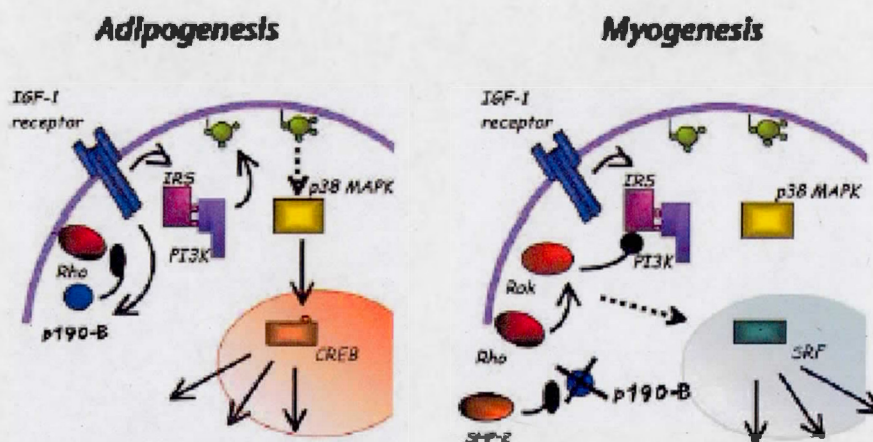


Figure 1.4 Rôle des Rho GTPases dans la différenciation adipogénique et cardiomyogénique. L'activation des récepteurs de l'insuline et/ou de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) induit la phosphorylation de la tyrosine 306 du régulateur des RhoGTPases, le p190-B RhoGAP, provoquant une régulation à la baisse des protéines Rho. Le régulateur de transcription adipogénique CREB est très sensible à l'activité des Rho. Si ce niveau est trop élevé, il y a inhibition de l'adipogenèse. L'activation des Rho est essentielle pour l'obtention de myocytes. Dans le cas de la myogenèse, le régulateur p190-B RhoGAP est inhibé par SHP-2, une tyrosine-phosphatase. SHP-2 est activée lorsqu'elle est phosphorylée par une activité kinasique telle que celle du récepteur de l'insuline ou celle du récepteur de l'IGF-1. SHP2 phosphorylée inhibe la phosphorylation de p190-B RhoGAP permettant l'activation des RhoGTPases. L'activation de SHP-2 par les récepteurs mentionnés n'est pas suffisante pour complètement inhiber p190-B RhoGAP, un deuxième signal extracellulaire, encore inconnu, est aussi essentiel. (Sordella *et al.*, 2003)

Certains facteurs de différenciation / transdifférenciation ont des effets pléiotropiques. Par exemple, T3 qui a un effet cardiomyogénique (Rodriguez *et al.*, 1994) sur les cellules P19 a un effet adipogénique sur des cellules souches embryonnaires lorsqu'il est combiné à l'Ins (Dani *et al.*, 1997). L'Ins, qui est une molécule induisant la différenciation en adipocyte peut aussi agir comme facteur pro-myogénique sur des cellules souches neuronales (Bani-Yaghoub *et al.*, 2004) permettant de générer des cellules battantes. L'Ins pourrait être un facteur de maturation pour les deux types cellulaires. L'Ins, via le récepteur à l'Ins, est un régulateur du métabolisme du glucose à la fois des cellules musculaires (squelettiques et cardiaques) et des adipocytes et, comme le montre la figure 1.5,

stimule la translocation du transporteur du glucose GLUT4 à la membrane (Litherland *et al.*, 2001). Cette translocation est aussi stimulée par la contraction musculaire (figure 1.6). Une équipe de recherche a montré la transdifférenciation de pré-adipocytes 3T3 en cellules similaires aux cellules de muscle lisse suite à la surexpression d'une protéase associée à la matrice extracellulaire (Abderrahim-Ferkoune *et al.*, 2004). Des extraits de cardiomyocytes de rats peuvent induire la différenciation de tissus adipeux humains en cellules battantes (Gaustad *et al.*, 2004).

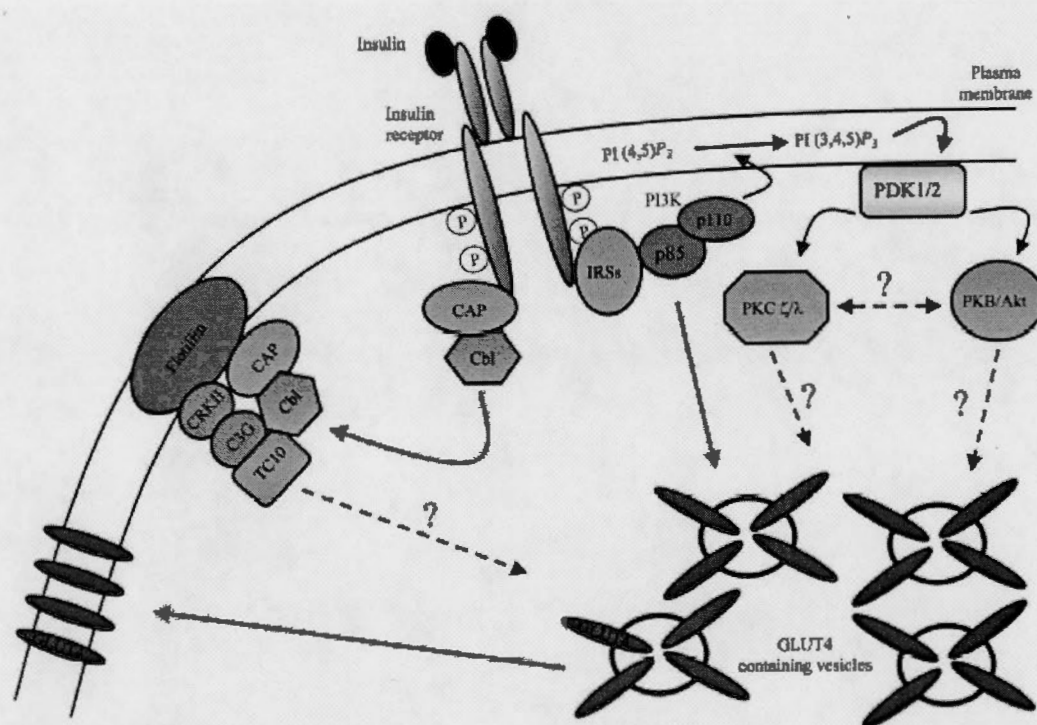


Figure 1.5 Signalisation médiant le transport du glucose stimulé par l'insuline. L'Ins induit l'autophosphorylation de son récepteur et active les substrats du récepteur à l'insuline (IRS) qui vont recruter la PI3-kinase (PI3K) à la membrane. La production subséquente de 3-phosphoinositides (PI(3,4,5)P₃) active de façon allostérique la protéine-kinase 1/2 phosphoinositide-dépendante (PDK 1/2) et permet le recrutement et l'activation de protéine-kinases B et C (PKB et PKC). Ces kinases vont jouer plusieurs rôles dans la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique. (Litherland *et al.*, 2001).

1.5 Le modèle P19 de cellules souches embryonnaires

1.5.1 Introduction

Les cellules adultes ayant déjà un phénotype défini ne permettent pas d'étudier les mécanismes de différenciation menant à l'obtention d'un type cellulaire mature. Par contre, les cellules souches embryonnaires n'exprimant aucun phénotype de cellule adulte sont un outil pertinent. Les cellules P19 utilisées dans le présent travail sont un modèle établi de cellules souches embryonnaires et permettent d'étudier la différenciation cellulaire *in vitro* (Andrews *et al.*, 2005). Les cellules P19 ont été obtenues à la suite de l'implantation de cellules d'un embryon de 7,5 jours de souris dans un testicule de souris adulte (McBurney, 1993). Comme elles se sont retrouvées dans un milieu non-utérin, les cellules implantées ont formé une tumeur appelée tératocarcinome. Cette tumeur contient des cellules différenciées de façon désordonnée ainsi que des cellules souches appelées cellules de carcinome embryonnaire (CE). La tumeur a été prélevée, dissociée et les cellules de CE isolées par sous-culture grâce à leur taux élevé de prolifération. Les cellules P19 ont un comportement de cellules souches embryonnaires comme le montre la figure 1.7 (McBurney, 1993). Ainsi, les cellules P19 sont pluripotentes et peuvent former des cellules dérivées de tous les feuillets embryonnaires *in vivo* comme *in vitro*. *In vivo*, un blastocyste normal qui se développe dans l'utérus et dans lequel on a implanté des cellules P19 génère un fœtus normal, viable et dont tous les tissus contiennent les dérivées correctement différenciées des cellules P19.

Les cellules P19 se comportent comme les cellules souches embryonnaires normales, mais ont l'avantage d'être plus faciles à cultiver. Les cellules souches embryonnaires ont une tendance à se différencier spontanément *in vitro* et cela, de façon désordonnée. Pour réduire ou annuler cette tendance, ces cellules doivent être cultivées sur des cellules nourricières et en présence de LIF (*leukemia inhibitory factor*). Au contraire, les cellules P19 se différencient peu de façon spontanée. Elles conservent leur caractère non-différencié en l'absence de cellules nourricières et de LIF.

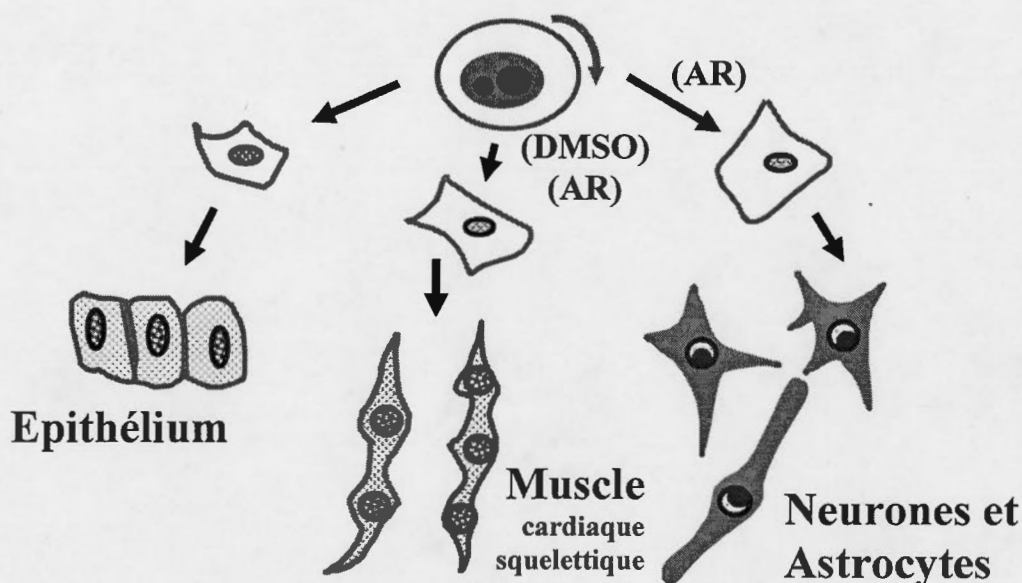


Figure 1.7 Le modèle cellulaire P19. Les cellules P19 de carcinome embryonnaire de souris sont un modèle de cellules souches embryonnaires puisqu'elles sont indifférenciées, hautement prolifératives et pluripotentes. Elles peuvent être différenciées en cellules des trois feuilletts embryonnaires *in vivo* et *in vitro*. L'acide rétinoïque (AR) permet la différenciation des cellules P19 en cellules du neuroectoderme (neurones et astrocytes) lorsqu'utilisé à une concentration de 10^{-6} M. En présence d'AR utilisé à une concentration de 10^{-7} , 10^{-8} M ou en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) utilisé à une concentration de 0,5-1%, les cellules P19 se différencient en cellules de muscle squelettique et cardiaque. (Adapté de McBurney)

1.5.2 Différenciation des cellules souches embryonnaires P19

Les cellules embryonnaires P19 ont la capacité de se différencier en cellules de l'endoderme et du mésoderme sous l'action du DMSO utilisé à des concentrations de 0,5 à 1% (Rudnicki et McBurney, 1987) ou de l'ectoderme sous l'action de l'AR utilisé à 10^{-6} M (Edwards et McBurney, 1983; Chiu *et al.*, 1995). Selon le Dr McBurney, ce n'est pas l'hétérogénéité des cultures P19 qui permet l'obtention de différents types cellulaires, mais plutôt le caractère pluripotent de ces cellules (MacPherson et McBurney, 1995). L'AR se fixe à ses récepteurs (RAR α , β , γ) pour activer la transcription de gènes cibles de la différenciation neuronale (McBurney, 1993; McBurney *et al.*, 1993; Boudjelal *et al.*, 1997) menant à la formation de neurones, de fibroblastes, d'astrocytes, de cellules de la microglie et d'oligodendrocytes (Chiu *et al.*, 1995). La différenciation induite par le DMSO permet l'obtention de cellules musculaires, mais les mécanismes d'induction ne sont pas encore compris (Grepin *et al.*, 1997; Skerjanc *et al.*, 1998).

1.6 L'ocytocine (OT) comme agent de différenciation

1.6.1 Structure de l'OT

C'est en 1928 que Kamm a réussi à cristalliser et à séparer deux substances de l'hypophyse : l'alpha-hypophamine ocytocique (nommée aujourd'hui ocytocine ou OT) et la beta-hypophamine vasopressive (nommée aujourd'hui vasopressine ou VP). En 1953 les structures de l'OT et de la VP ont été élucidées par Du Vigneaud et se sont révélées similaires (figure 1.8). Deux ans plus tard, ce chercheur a reçu le prix Nobel pour la détermination de la séquence en acides aminés de l'OT ainsi que pour sa synthèse en laboratoire.

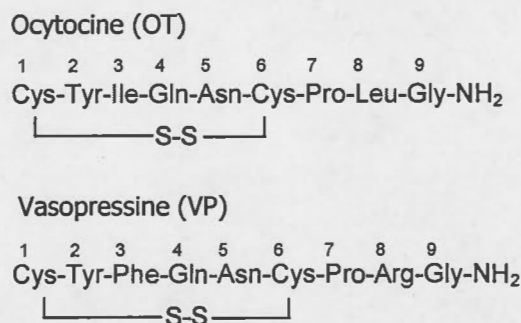


Figure 1.8 Structure primaire de l'ocytocine et la vasopressine. L'ocytocine et la vasopressine ont une séquence en acides aminés similaire ne différant qu'au niveau des acides aminés en positions 3 et 8 (Du Vigneaud *et al.*, 1953).

1.6.2 Sites et étapes de synthèse

Le premier site de synthèse découvert de l'OT est l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'OT est synthétisée sous la forme d'un précurseur (pré-pro-OT) constitué d'un peptide signal ainsi que des séquences de l'OT et de la neurophysine-I (NP-I) séparées par trois acides aminés (Gly-Lys-Arg). Le clivage du peptide signal forme la pro-OT (Figure 1.9), laquelle est ensuite convertie en OT mature par l'action successive d'une prohormone-convertase, d'une carboxypeptidase de type B (carboxypeptidase E) et d'une enzyme d'amidation, la peptidylglycine α -amidating monooxygénase (Altstein et Gainer, 1988).

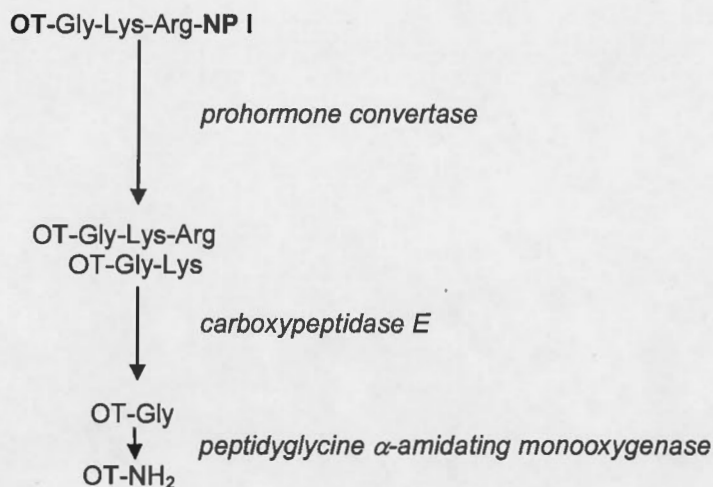


Figure 1.9 Biosynthèse de OT à partir de sa forme pro-OT. La prohormone OT-Gly-Lys-Arg-NP-I est convertie en OT et neurophysine-I (NP-I) par l'action d'une endopeptidase de type convertase qui clive après des acides aminés basiques. Ensuite, une carboxypeptidase de type B (la carboxypeptidase E) clive l'Arg et la Lys surnuméraires pour former l'intermédiaire OT-Gly. Ce dernier subit une amidation par l'enzyme d'amidation (peptidylglycine α -amidating monooxygenase) menant à la forme active de OT (Altstein et Gainer, 1988).

Par la suite, des sites de synthèse de l'hormone furent découverts dans plusieurs tissus incluant les systèmes reproductifs femelle (utérus, placenta et ovaire) et mâle (testicule, épидидyme et prostate), ainsi que les glandes surrénales, la glande pinéale, le thymus et le cerveau des deux sexes (Dogterom *et al.*, 1977; Ang et Jenkins, 1984; Gauquelin *et al.*, 1988; Argiolas *et al.*, 1990; Gimpl et Fahrenholz, 2001). Plus récemment, la synthèse de l'OT fut découverte dans le cœur et le système vasculaire (Gutkowska *et al.*, 1997). L'OT a une demi-vie de 3 à 5 min chez l'humain et est métabolisée au niveau du foie, du rein, des glandes mammaires et de l'utérus chez la femme enceinte. La dégradation de l'OT est réalisée par une enzyme plasmatique, l'ocytocinase, enzyme aussi présente dans le placenta (Fabian *et al.*, 1969).

1.6.3 Différents rôles et mécanismes d'action

L'OT hypophysaire est sécrétée dans la circulation systémique et elle agit comme hormone endocrine sur des cellules à distance du lieu de libération incluant les cellules de l'utérus et des glandes mammaires. L'activité ocytocique (gr. *oxutoki*, *okutokios*, *okus* : rapide ; *tokos* : accouchement) fut découverte par H. H. Dale (1906) qui a montré que l'injection intraveineuse d'extraits d'hypophyse induit des contractions utérines chez les chattes (den Hertog *et al.*, 2001) ce qui lui a valu le prix Nobel en 1936. L'OT est l'agent utérotonique connu le plus puissant. Cette hormone est utilisée pour induire et stimuler les contractions utérines lors de l'accouchement ou pour provoquer l'avortement, en

opérant sur le muscle lisse de l'utérus. En 1910, Ott et Scott ont montré que ces mêmes extraits augmentent la sécrétion du lait chez la chèvre. L'OT joue ainsi un rôle physiologique dans l'allaitement (Nishimori et Matzuk, 1996; Wagner *et al.*, 1997). En plus d'être la seule substance naturelle connue provoquant l'éjection du lait, elle stimule la prolifération des alvéoles et le développement de la glande mammaire suite à l'accouchement (Young *et al.*, 1998). Outre ses actions bien connues dans l'accouchement et l'allaitement, l'OT a aussi des effets antidiurétiques (rapportés par Von den Velven dès 1913) ainsi que des rôles dans la prise d'eau et de nourriture, la mémoire sociale et les liens affectifs (entre parents et rejetons, entre partenaires dans la reproduction) (Insel, 1997; Winslow et Insel, 2002). Des niveaux réduits d'OT et de son récepteur sont associés à des troubles mentaux comme l'autisme (Hollander *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Hammock et Young, 2006).

C'est au début des années 1980 que le mécanisme utérotonique traduisant le signal hormonal a été élucidé (Fuchs *et al.*, 1984). Lorsque l'OT lie son récepteur, elle induit une augmentation du taux d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) intracellulaire, ce qui entraîne une libération des ions Ca^{2+} contenus dans le réticulum endoplasmique (RE) vers le cytoplasme. Voici les différentes étapes menant à la libération du calcium. Tout d'abord, l'OT fixe son récepteur couplé à une protéine G, ce qui stimule l'activité de la phospholipase C (PLC) et la production d'IP3. La PLC hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), générant le 1,2-diacylglycérol (DAG) qui reste ancré à la membrane et l'IP3 hydrosoluble qui se lie à des canaux calciques du RE. La libération subséquente de Ca^{2+} vers le cytosol induit une contraction. Suite à la contraction, l'IP3 est hydrolysé en inositol-1,4-bisphosphate afin de ne plus affecter l'efflux du calcium. Le niveau d'OT dans la circulation systémique augmente chez les femmes enceintes (de Geest *et al.*, 1985). Bien que l'OT hypothalamique soit essentielle pour la lactation (Mena *et al.*, 1978), elle ne l'est pas pour l'accouchement puisque l'utérus lors de l'accouchement autoproduit de l'OT (Lefebvre *et al.*, 1992; Lefebvre *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 1998). En fait, les œstrogènes produisant la chute du potentiel membranaire de repos augmente le nombre de récepteurs pour l'OT sur les cellules utérines (Wu *et al.*, 1996). Par contre, un accouchement normal peut avoir lieu chez le rongeur et l'humain même sans OT circulante causée par une glande hypophysaire non fonctionnelle (Lefebvre *et al.*, 1992), une augmentation de l'activité ocytocinase ou une inactivation du gène de l'OT (souris *knock out OT^{-/-}*) (Nishimori et Matzuk, 1996).

1.6.4 Rôle de l'OT dans l'homéostasie cardiovasculaire et la différenciation cardiaque

En 1997, l'équipe du Dr Gutkowska démontra pour la première fois l'existence d'un système complet de l'OT avec son récepteur (OTR) dans le cœur et le système cardio-vasculaire chez le rat (Gutkowska *et al.*, 1997; Jankowski *et al.*, 1998). Cette équipe a montré que OT/OTR joue un rôle de régulateur de la pression sanguine via la libération du peptide natriurétique auriculaire (ANP), un puissant vasodilatateur. De plus, l'OT exerce une action inotropique et chronotrope négative sur le cœur isolé et perfusé (Favaretto *et al.*, 1997; Mukaddam-Daher *et al.*, 2001). En accord avec les études sur le cœur isolé d'animaux normaux, de l'hypotension et une augmentation du gain baroréflexe à la pression sanguine ont été observés chez des souris OT^{-/-} (Michelini *et al.*, 2003).

En 2002 l'équipe du Dr Paquin en collaboration avec celle du Dr Gutkowska démontra que l'OT est cardiomyogénique sur la lignée P19 de cellules souches embryonnaires de souris (Paquin *et al.*, 2002). Cet article montra de plus l'implication du système complet OT/OTR dans cette voie de différenciation puisque OTA, un antagoniste spécifique de OTR, inhibe la différenciation cardiaque induite par l'OT. Une étude a montré que l'OT exerce aussi une action cardiomyogénique sur les cellules souches somatiques du cœur (Matsuura *et al.*, 2004). Comme il a été mentionné dans la section 1.4.2, des études réalisées sur des pré-adipocytes 3T3 ont rapporté un effet inhibiteur de l'OT sur la maturation en adipocytes.

1.7 Présentation de quelques marqueurs phénotypiques

Le présent travail porte sur la différenciation cellulaire. Pour suivre la différenciation, il est nécessaire de choisir des marqueurs phénotypiques pertinents. Voici donc des informations sur les marqueurs utilisés dans ce travail.

a) SSEA-1

Utilisé comme marqueur de l'état non-différencié des cellules souches, l'antigène SSEA-1 (*Stage Specific Embryonic Antigen-1*) est présent chez la souris sur des glycoprotéines et des glycolipides sous la forme d'un trisaccharide fucosyl-N-acétyl-lactosamine (Solter et Knowles, 1978; Marani *et al.*, 1986; Tetteroo *et al.*, 1996). SSEA-1 est exprimé à la surface des cellules P19 lorsqu'elles sont dans leur état indifférencié et l'antigène disparaît au cours de la différenciation.

b) GATA-4

GATA-4 fait partie de la famille des facteurs de transcription GATA composée des membres GATA-1 à GATA-6. Les facteurs GATA sont essentiels au développement de plusieurs organes et

tissus des vertébrés. GATA-1, -2 et -3 sont retrouvés dans les cellules souches hématopoïétiques, régulant l'expression des gènes spécifiques aux lymphocytes T, aux cellules érythroïdes et aux mégacaryocytes. GATA-4, -5 et -6 sont retrouvés dans les tissus dérivés des feuilletts embryonnaires mésodermique et endodermique comme le cœur, le foie, les poumons, les gonades et l'intestin. Le facteur GATA-4 est essentiel au développement cardiaque en régulant l'expression d'autres gènes cardiaques comme le gène de la chaîne lourde de la myosine (MHC) (Molkentin *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2003).

c) Troponine I (TpnI) cardiaque

La troponine est une protéine composée de trois sous-unités : C, I et T. Elle facilite l'interaction entre l'actine et la myosine en liant le Ca^{2+} aidant ainsi les divers mouvements cellulaires. La sous-unité C, responsable de la liaison du Ca^{2+} , se retrouve dans les cellules du muscle cardiaque et du muscle squelettique lent et elle est impliquée dans la régulation de l'excitation-contraction cellulaire. La troponine I est la sous-unité inhibitrice de la troponine et est retrouvée à la fois dans les cellules des muscles cardiaque et squelettique. La troponine I cardiaque est exclusivement retrouvée dans le muscle cardiaque. La troponine T, l'unité de liaison à la tropomyosine, se retrouve à la fois dans les cellules du muscle squelettique et cardiaque. (Parmacek et Leiden, 1989; Ausoni *et al.*, 1994; Potter *et al.*, 1995) La figure 1.10 illustre l'organisation des trois sous-unités lors de la contraction et de la relaxation musculaires.

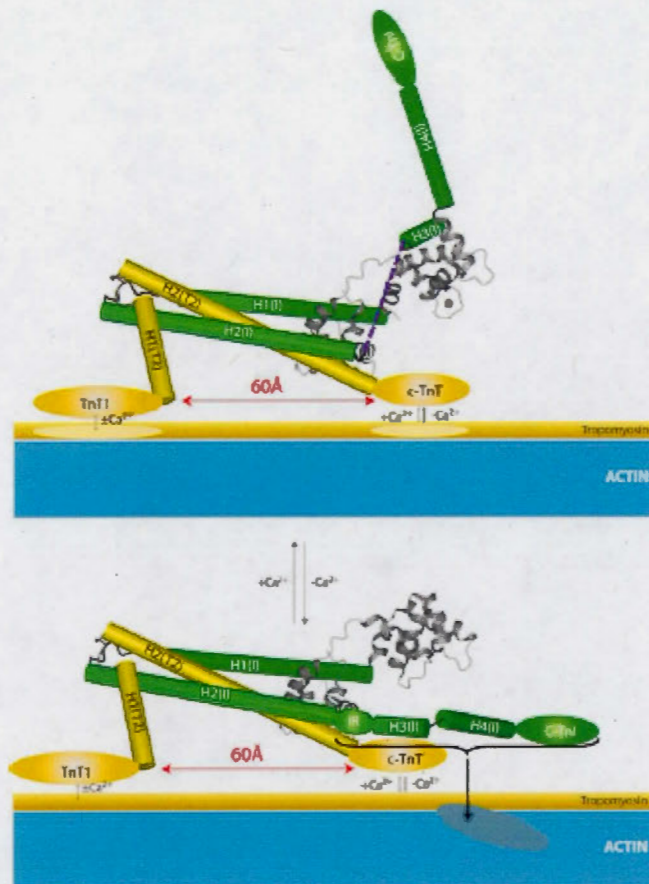


Figure 1.10 Implication du Ca^{2+} dans la conformation de la troponine cardiaque. Lors de la contraction musculaire, le domaine N-terminal de la TpnC (gris) se remplit d'ions Ca^{2+} , permettant sa fixation au domaine de contrôle de la TpnI (vert). Lors de la relaxation, le départ des ions Ca^{2+} de la TpnC permet le relâchement du domaine contrôle de la TpnI et induit ainsi un changement de configuration de la tropomyosine (jaune) et de l'actine (bleu) via la TpnT. (Li *et al.*, 2004)

d) PPAR γ

Les PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) sont des récepteurs hormonaux nucléaires pouvant être activés par une variété de composés comme les prostaglandines et les acides gras. Trois isoformes de PPAR existent : PPAR α , PPAR β et PPAR γ qui vont promouvoir la transcription génique en formant des hétérodimères avec des membres d'autres familles de récepteurs nucléaires comme les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs stéroïdiens (RXR). PPAR α est abondant dans les hépatocytes où il régule l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras. PPAR β est le plus largement distribué et se retrouve généralement en

grande quantité. PPAR γ se retrouve principalement dans les tissus adipeux et régule la différenciation en adipocytes. (Brun *et al.*, 1996; Mansen *et al.*, 1996; Sterchele *et al.*, 1996)

e) ap2

Le facteur ap2 fait partie de la grande famille des FABP (*fatty acid-binding proteins*) qui sont des protéines cytoplasmiques de 14-15 kDa jouant un rôle essentiel dans la balance du métabolisme des lipides et du glucose dans les cellules. Les FABP sont impliquées dans l'absorption et le transport d'acides gras ou d'autres ligands hydrophobes à l'intérieur de la cellule par transport passif ou actif. L'expression des FABP a une spécificité tissulaire. Ainsi A-FABP (FABP4) se retrouve dans le tissu adipeux, B-FABP (FABP7) dans le cerveau, E-FABP (FABP5) dans les épithéliums, H-FABP (FABP3) dans le cœur et les muscles striés, I-FABP (FABP2) dans l'intestin, L-FABP (FABP1) dans le foie, M-FABP (FABP8) dans la myéline et T-FABP (FABP9) dans les testicules. La protéine ap2 (ou A-FABP / FABP4) compte pour environ 1% des protéines totales retrouvées dans le cytoplasme des adipocytes. (Veerkamp et Maatman, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1996; Chmurzynska, 2006)

f) Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (PA) est une phosphatase qui hydrolyse les phosphomonoesters pour libérer un groupement phosphate. La PA est notamment présente sur les ostéocytes où elle a une très forte activité hydrolytique. Cette activité peut être mesurée à l'aide du substrat modèle de la PA, le pNPP (para-nitrophénylphosphate) qui est hydrolysé en pNP (para-nitrophénol), une molécule de couleur jaune pouvant être dosée par absorbance à 410 nm (Aubin *et al.*, 1995). Comme cette enzyme est aussi fortement exprimée dans les cellules en apoptose ou en nécrose, un test de la viabilité cellulaire permet de déterminer si la mortalité cellulaire a une influence sur l'expression de la PA dans l'expérimentation (Marom *et al.*, 2005).

1.8 Hypothèse et objectifs spécifiques

En examinant les considérations suivantes :

- 1- Il existe une communication possible entre les voies de différenciation cardiomyogénique et adipogénique puisque (a) des facteurs adipogéniques comme l'Ins et la T3 semblent posséder un pouvoir cardiomyogénique, (b) des cellules souches de tissu adipeux peuvent générer des cardiomyocytes, et (c) des cellules souches de moelle osseuse peuvent générer des adipocytes et, quoiqu'à un degré moindre, des cardiomyocytes.
- 2- Des acides gras et des facteurs adipocytaires ont une action bénéfique sur le cœur.

- 3- L'OT, cardiomyogénique sur des cellules souches, a toutefois un effet inhibiteur sur la maturation de pré-adipocytes en adipocytes.

nous avons émis l'hypothèse que, d'une part, l'OT pourrait favoriser le programme cardiomyogénique dans des conditions adipogéniques et, d'autre part, que les conditions adipogéniques pourraient augmenter le rendement cardiomyogénique de l'hormone. Dans ce contexte nous avons utilisé le modèle P19 pour :

- (a) établir si des conditions connues pour être adipogéniques avec les cellules souches embryonnaires induisent la différenciation de cellules P19 en adipocytes et en cardiomyocytes;
- (b) déterminer si la combinaison des conditions adipogéniques avec l'OT favorisent la production des cardiomyocytes sur celle d'adipocytes;
- (c) comparer l'efficacité cardiomyogénique de l'OT dans le protocole de différenciation cardiaque « classique » avec et sans gouttes pendantes (on entend par gouttes pendantes une agrégation en gouttes suspendues sur le couvercle du Pétri) et dans le protocole adipogénique.

La différenciation adipogénique a été évaluée par histologie après coloration des lipides avec le colorant Oil-Red-O et par rétrotranscription-réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) pour le marqueur adipogénique PPAR γ . La différenciation cardiomyogénique a été évaluée par le relevé de colonies de cellules battantes ainsi que par RT-PCR et immunobuvardage pour le marqueur TpnI cardiaque. Une étude préliminaire a aussi été réalisée pour déterminer si OT inhibe la génération d'adipocytes à partir de MSC de moelle osseuse de rat.

Les résultats pourraient aider à optimiser les conditions cardiomyogéniques afin d'améliorer le rendement en cardiomyocytes qui demeure pour le moment faible. De meilleures conditions peuvent contribuer au développement de thérapies cellulaires pour le cœur.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Culture et différenciation des cellules P19

2.1.1 Culture des cellules P19 indifférenciées

Les cellules P19 furent maintenues en culture selon le protocole établi par Rudnicki et McBurney (1987). Les cellules furent cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée d'humidité contenant 5% de CO₂ et dans un milieu complet de propagation (MCP) composé d' α -MEM (*α -Modified Eagle Essential Medium*, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplémenté de 10% de sérum de bœuf foetal (FBS) inactivé à la chaleur (Cansera International, Rexdale, Ontario, Canada) ainsi que de 50 U/mL de pénicilline et de 50 μ g/mL de streptomycine (Gibco BRL). Les cellules furent divisées toutes les 48 h. Après retrait du milieu de culture, les cellules sont lavées avec du tampon phosphate salin (PBS : 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,02% KH₂PO₄ et 0,115% Na₂HPO₄, pH 7,3), dissociées par pipettages après incubation dans une solution de 0,025% trypsine et 1 mM EDTA (Gibco BRL) et réensemencées à raison d'un million de cellules dans 10 mL de MCP dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre (Sarstedt, Newton, Caroline de Nord, USA).

2.1.2 Protocole cardiomyogénique « classique »

Les cellules P19 furent différenciées en cardiomyocytes selon le protocole de Paquin, Danalache et coll (2002) comme le montre la figure 2.1A. À jour zéro (J0) de la différenciation, 0,25 million de cellules a été ensemencé dans un pétri bactériologique de 60 mm de diamètre (VWR International, Mississauga, Ontario, Canada) contenant 5 mL de milieu complet de différenciation (MCD : α -MEM supplémenté de 5% de FBS, 5% de sérum bovin (DBS, Cansera International), 50 U/ml de pénicilline et 50 μ g/ml de streptomycine) auquel a été ajouté 10⁻⁷ M d'OT (Peninsula Laboratories). Le pétri bactériologique ne permet pas l'adhésion des cellules au plastique et les cellules s'associent donc les unes aux autres pour former des agrégats en suspension ; ces agrégats sont souvent appelés corps embryoïdes. Le milieu de différenciation a été renouvelé après deux jours d'agrégation. Après quatre jours d'agrégation, les agrégats ont été transférés dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre contenant 10 mL de MCP, en absence d'OT. Le milieu de culture a été changé aux 48 h. Dans une variante de ce protocole de base, 10⁻⁷ M d'OT a été ajouté au milieu de culture post-agrégation. Dans les différenciations témoins (cellules non induites ou NI), il n'y a pas eu ajout d'OT durant la période d'agrégation ni durant la période en culture adhérente subséquente.

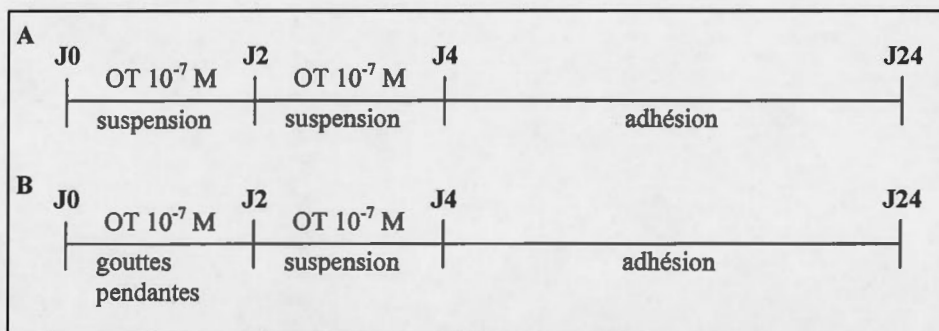


Figure 2.1 Schéma temporel du protocole cardiomyogénique « classique » sans et avec incorporation de gouttes pendantes. Les cellules P19 furent cultivées (A) en suspension en large volume des jours J0 à J4 ou (B) en gouttes pendantes des jours J0 à J2 et en suspension de J2 à J4 dans le MCD additionné de 10^{-7} M d'OT, puis cultivées en couches adhérentes dans du MCP en absence d'OT. Deux autres variantes ont été testées : absence d'OT de J0 à J24 (culture non-induites ou NI) et présence d'OT de J0 à J24.

2.1.3 Protocole cardiomyogénique « classique » avec incorporation de gouttes pendantes

Le protocole est celui décrit à la section 2.1.2 sauf que l'agrégation a débuté en gouttes pendantes (figure 2.1B). À J0, 64 gouttes de 20 μ l contenant chacune 1000 cellules dans du MCD additionné de 10^{-7} M d'OT ont été déposées dans le couvercle d'un pétri bactériologique de 100 mm de diamètre (Sarstedt) rempli de PBS. Après 48h, les gouttes de cinq pétris furent aspirées avec une pipette pasteur et déposées dans un tube à centrifuger de 50 mL (Sarstedt) afin de sédimenter les agrégats. Les agrégats furent repris dans 10 mL de MCD additionné de 10^{-7} M d'OT et mis en culture pour 48 h dans un Pétri bactériologique de 100 mm de diamètre (VWR International). Après quatre jours d'agrégation, les agrégats (l'équivalent de 64 gouttes) ont été transférés dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre contenant 10 mL de MCD, en absence d'OT. Le milieu de culture a été changé aux 48 h. Dans une variante de ce protocole de base, 10^{-7} M d'OT a été ajouté au milieu de culture post-agrégation. Des différenciations témoins (cellules non induites ou NI) ont été faites sans ajout d'OT.

2.1.4 Protocole adipogénique

La différenciation des cellules P19 en adipocytes fut adaptée d'un protocole de différenciation de cellules souches embryonnaires murines (Dani *et al*, 1997) comme le montre la figure 2.2. Les cellules P19 furent cultivées en gouttes pendantes de 20 μ l à raison de 1000 cellules par goutte dans du MCD. 64 gouttes ont été déposées dans le couvercle d'un pétri bactériologique de 100 mm de diamètre (Sarstedt) rempli de PBS pour 48 h. Par la suite, les gouttes de cinq pétris furent aspirées avec une pipette pasteur et déposées dans un tube à centrifuger de 50 mL afin de faire sédimenter les agrégats. Le vieux milieu fut alors enlevé par aspiration et les agrégats transférés dans un unique pétri bactériologique de 60 mm de diamètre contenant 5 mL de MCD supplémenté de 10^{-6} M d'AR (Sigma)

pour 48 h. Après ces 48 h, la suspension d'agrégats a été transférée dans un tube 50 mL, les agrégats sédimentés et 50% du vieux milieu a été retiré. La suspension cellulaire restante a été transférée dans un pétri bactériologique de 60 mm et son volume complété à 5 mL avec du MCD neuf contenant 10^{-6} M d'AR. Après 24 h de culture, les agrégats ont été de nouveau récoltés, lavés avec du PBS et remis dans des pétris bactériologiques pour 48 h dans du MCD en absence d'AR. Les agrégats ont été ensuite transférés dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre contenant 10 mL de MCP supplémenté de 85 nM d'Ins (Sigma) et 2 nM de T3 (Sigma) ; le milieu de maturation fut renouvelé aux 48 h. Dans une variante de ce protocole de base, 10^{-7} M d'OT a été ajouté au milieu de culture post-agrégation. Les différenciations témoins (cellules non induites ou NI) n'ont reçu aucun agent inducteur.

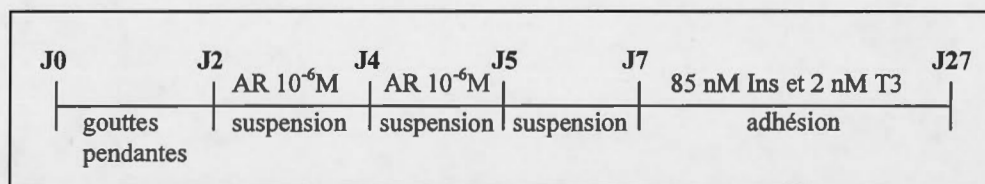


Figure 2.2 Schéma temporel du protocole adipogénique. Les cellules P19 furent cultivées en gouttes pendantes des jours J0 à J2 dans du MCD, en suspension de J2 à J5 dans le MCD additionné de 10^{-6} M d'AR, et de J5 à J7 dans du MCD en absence d'AR. Par la suite les cellules furent cultivées en couches adhérentes dans du MCP supplémenté de 85 nM d'Ins et 2 nM de T3. D'autres variantes ont été testées incluant l'absence d'agent de J0 à J27 (cultures non-induites ou NI).

2.1.5 Protocole ostéogénique

Les conditions de différenciation des cellules P19 en ostéocytes furent adaptées de protocoles utilisés avec des cellules souches embryonnaires murines (Chaudry *et al*, 2004 et Phillips *et al*, 2001). La procédure fut la même que pour la différenciation en adipocytes (section 2.1.4 et figure 2.2) à l'exception de la composition du milieu de maturation (jours J7 à J27), lequel contenait 50 μ g/mL d'acide ascorbique (Sigma) et 10 mM de β -glycérophosphate (Sigma). L'effet de l'OT sur la différenciation ostéogénique a été évalué en ajoutant 10^{-7} M de l'hormone au milieu de maturation.

2.2 Culture et différenciation des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse (MSC)

2.2.1 Préparation des MSC

Les cellules furent extraites de fémurs et de tibias de rats Sprague-Dawley de 200-300 g (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) selon les procédures de l'équipe du Dr Caplan (Lennon *et al*, 1995). Brièvement, les rats furent tout d'abord endormis dans une atmosphère de $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (2:1) et euthanasiés avec 100% de CO_2 . Les pattes postérieures furent par la suite rasées et les rats plongés

dans l'éthanol 70% pour 5 min. Les pattes furent dénudées de leur peau et de leur tissu musculaire avant d'en retirer les fémurs et les tibias et de sectionner les extrémités de ces os. La moelle fut ensuite extraite par injection de milieu DMEM complet (DMEMC) dans la lumière des tubes osseux. Le DMEMC était composé de DMEM-HG (*Dulbecco Modified Eagle Medium High Glucose*, Gibco BRL) supplémenté de 10% de FBS inactivé à la chaleur (Cansera), 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules recueillies furent individualisées par passage dans trois aiguilles de seringue de calibre différent (18G, 20G et 22G) et ensemencées à la densité de 1,4 million par centimètre carré dans des pétris tissulaires contenant du DMEMC et cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée d'humidité contenant 5% de CO₂. Les MSC adhèrent au support de culture alors que les cellules hématopoïétiques demeurent en suspension et sont retirées lors des changements de milieu. Après dix jours de culture primaire, les MSC ont été lavées deux fois au PBS, dissociées par l'ajout de PBS contenant 0,25% trypsine et 1 mM EDTA (Gibco BRL) et réensemencées à raison d'un million dans 10 mL de DMEMC dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre.

2.2.2 Culture des MSC indifférenciées

Les MSC furent maintenues en culture pour un maximum de 4 passages après la mise en culture initiale. Les passages sont faits lorsque les cellules sont à 90-100% de confluence (environ aux 12 jours). Le vieux milieu fut retiré et les cellules lavées deux fois au PBS, dissociées par l'ajout de trypsine-EDTA et réensemencées à raison d'un million dans 10 mL de DMEMC dans un pétri tissulaire de 100 mm de diamètre.

2.2.3 Différenciation des MSC en adipocytes

La différenciation des MSC fut adaptée de protocoles adipogéniques décrits pour la souris (Miki *et al*, 2001 et Tropel *et al*, 2004). Les MSC de rats ont été cultivées jusqu'à 100% de confluence et induites à se différencier par l'ajout du milieu adipogénique composé de DMEMC additionné de 5 µg/mL d'Ins, 1 µM de Dex (Sigma) et 0,5 mM d'IBMX (Sigma). Les cellules furent cultivées dans ce milieu pendant 15 jours avec renouvellement de milieu aux 48 h et ce, sans lavage des cellules. Des cellules ont aussi été traitées avec le milieu adipogénique contenant 10⁻⁷ M d'OT.

2.2.4 Différenciation des MSC en ostéocytes

La différenciation des MSC fut adaptée de protocoles ostéogéniques décrits pour la souris (Martin *et al*, 2002 et Tropel *et al*, 2004). Le protocole utilisé fut le même que pour la différenciation en adipocytes sauf pour la composition du milieu de différenciation et le temps de différenciation. Le milieu ostéogénique fut du DMEMC additionné de 0,1 µM de Dex, 0,05 mM d'acide ascorbique

(Sigma) et 10 mM de β -glycérophosphate (Sigma). Les cellules furent cultivées dans ce milieu pendant 28 jours avec renouvellement de milieu aux 48 h et ce, sans lavage des cellules. Des cellules furent aussi traitées avec du milieu ostéogénique contenant 10^{-7} M d'OT.

2.3 Histochimie

2.3.1 Quantification relative des cellules au cristal violet

Les cellules ont été fixées pendant 20 min avec du p-formaldéhyde 4% dans du PBS. Les cellules ont été lavées au PBS trois fois, colorées par une incubation de 30 min dans du PBS contenant du cristal violet 0,1% p/v, puis de nouveau lavées trois fois au PBS. La coloration a été révélée par l'ajout d'acide acétique 10%, puis les extraits acides furent transférés dans une microplaque de 96 puits et dosés par absorbance à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (THERMOmax™ ; Molecular Devices, Menlo Park, Californie, USA).

2.3.2 Analyse des adipocytes par l'Oil-Red-O

Les cellules furent fixées au p-formaldéhyde pour 20 min à la température de la pièce puis lavées deux fois au PBS, perméabilisées au propylène glycol pendant 3 min, puis incubées avec une solution d'Oil-Red-O (Sigma; 0,5% du colorant dans 60% isopropanol et 40% H₂O, filtrée sur filtre Whatman #1) pendant 60 min. Les cellules furent ensuite lavées trois fois au PBS, couvertes de propylène glycol 60% pendant 1 min, rincées à l'eau distillée et séchées à 37°C pendant 1 h. En dernier lieu, le colorant fut extrait des cellules par l'ajout d'isopropanol et les extraits transférés dans une microplaque de 96 puits pour une mesure d'absorbance à 510 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

2.3.3 Analyse des ostéocytes via la phosphatase alcaline

Les ostéocytes provenant de la différenciation des MSC furent colorés au bleu de tétrazolium (Sigma) selon les recommandations du fabricant. Les cultures cellulaires furent fixées avec du méthanol froid (-20°C) pendant 2 min, séchées sous un faible jet d'air, réhydratées pendant 10 min avec un tampon contenant 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl et 10 mM MgCl₂, puis incubées avec une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (0,165 mg/mL) et Nitroblue Tetrazolium (0,33 mg/mL) pour 10 min. Enfin les cultures furent rincées à l'eau nanopure puis examinées au microscope.

Les ostéocytes provenant de la différenciation des cellules P19 furent analysés par le dosage colorimétrique de la phosphatase alcaline. Les cellules furent fixées avec du méthanol froid (-20°C) pour 2 min, rincées trois fois avec de l'eau nanopure, et incubées pour 20 min, à 37°C, avec une

solution de 1 mg/ml de p-nitrophényl phosphate (pNPP) dissout dans un tampon bicarbonate de sodium 50 mM pH 9,6 additionné de 1 mM $MgCl_2$. Après arrêt de la réaction par l'ajout de 0,5 mL de NaOH 3 M, les extraits alcalins furent transférés dans une microplaque de 96 puits et lus en absorbance à 410 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Un marquage de la minéralisation de la matrice des ostéocytes P19 a aussi été réalisé selon la technique de van Kossa. Pour ce faire, les cellules furent fixées au p-formaldéhyde pour 20 min à la température de la pièce, puis lavées trois fois avec de l'eau nanopure et incubées à l'obscurité 30 min avec une solution de nitrate d'argent 5%. La solution de nitrate d'argent fut retirée et remplacée par de l'eau nanopure. Les cellules furent incubées sous une lumière de 40 W pendant 1 h, puis avec une solution de thiosulfate de sodium pour 2 min, lavées trois fois avec de l'eau nanopure et observées sous microscope.

2.4 Rétrotranscription et réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

2.4.1 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN des cellules fut réalisée avec le Trizol (Invitrogen Life Technologie, Burlington, Ontario, Canada) selon les procédures du manufacturier. Les cellules d'un pétri tissulaire de 100 mm furent lavées deux fois au PBS, raclées avec un policeman dans 1 mL de PBS, récoltées dans un eppendorf (Sarstedt) et centrifugées à 1000 g à l'aide d'une microcentrifugeuse Eppendorf 5415C (Brinkmann Instruments Inc., Hambourg, Germanie) pendant 1 min. Le surnageant fut par la suite enlevé et le culot repris dans 1 mL de Trizol suivi de 15 passages dans l'embout de la pipette puis laissé à température de la pièce pour 5 min. Du chloroforme (200 μ L) fut ajouté à l'eppendorf et le tout agité vigoureusement pendant 15 sec, incubé 2-3 min à température de la pièce et centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 10 min. La phase aqueuse contenant l'ARN débarrassé des protéines a été récupérée. L'ARN fut précipité en ajoutant 500 μ L d'isopropanol à la phase aqueuse et en mélangeant le tout par 3-4 inversions de l'eppendorf. Suite à une incubation de 10 min à température de la pièce, l'eppendorf fut centrifugé 10 min à 12000 g à 4°C. Le culot d'ARN fut débarrassé du surnageant, lavé avec 1 mL d'éthanol 75%, et resuspendu au vortex. L'eppendorf fut par la suite centrifugé 5 min à 7500 g à 4°C et le culot asséché pendant 10-15 min à l'air libre et suspendu dans 30 μ L d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC, Sigma).

L'ARN fut quantifié par dosage à 260 nm après dilution dans de l'eau traitée au DEPC. Pour ce faire, la mesure d'absorbance obtenue fut insérée dans la formule suivante où une unité d'absorbance équivaut à 40 μ g/mL d'ARN:

$[ARN] = 40 \mu\text{g/mL} \cdot A_{260} \cdot \text{facteur de dilution}$

L'ARN fut dilué à une concentration de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.4.2 Rétrotranscription (RT)

La RT fut réalisée avec la trousse « Omniscript Reverse Transcriptase kit » de QIAGEN (Mississauga, Ontario, Canada) selon le protocole du manufacturier. La solution d'ARN $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ fut tout d'abord chauffée à 65°C pendant 5 min puis refroidie à 4°C . Un aliquot de $5 \mu\text{L}$ a été ajouté au mélange réactionnel de rétrotranscription composé de $7 \mu\text{L}$ d'eau « RNase Free », $2 \mu\text{L}$ de tampon RT 10X, $2 \mu\text{L}$ de dNTP (5 mM chacun), $1 \mu\text{L}$ de transcriptase inverse (tous de QIAGEN), $2 \mu\text{L}$ de l'oligo-dT 12-18 ($10 \mu\text{M}$, Amersham Biosciences, Oakville, Ontario, Canada) et $1 \mu\text{L}$ de l'inhibiteur de RNase ($10 \text{ U}/\mu\text{L}$, Amersham Biosciences). La solution finale a été incubée à 37°C pendant 60 min, chauffée pendant 5 min à 95°C afin de dénaturer la transcriptase, et conservée à -20°C jusqu'à l'analyse par PCR.

2.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet d'amplifier de plusieurs fois une partie précise d'un ARNm d'intérêt via l'utilisation d'amorces complémentaires spécifiques. Les séquences des amorces utilisées ainsi que la taille (pb) des produits PCR sont résumées dans le tableau 2.1, et les courbes de mise au point du nombre de cycles d'amplification sont présentées en appendice A. Les amorces furent synthétisées par la compagnie Invitrogen Life Technologies et reconstituées dans l'eau traitée au DEPC à une concentration de $100 \mu\text{M}$. La PCR fut réalisée avec la trousse « Taq PCR Core Kit » (QIAGEN) selon les recommandations du manufacturier, avec des modifications. Le mélange pour la PCR fut composé de $12,8 \mu\text{L}$ d'eau traitée au DEPC, de $2,5 \mu\text{L}$ de tampon PCR 10X, de $0,5 \mu\text{L}$ de dNTP (10 mM chacun), de $0,2 \mu\text{L}$ de la Taq DNA polymérase (tous de QIAGEN) et de $1 \mu\text{L}$ de chacune des amorces ($10 \mu\text{M}$ sens et $10 \mu\text{M}$ anti-sens). En dernier lieu, $2 \mu\text{L}$ du produit de la rétrotranscription furent ajoutés puis le mélange soumis au programme suivant du thermocycleur Mastercycler gradient (Eppendorf, Mississauga, Ontario, Canada) : 96°C pour 15 sec, 54°C pour 30 sec et 75°C pour 90 sec pour chaque cycle d'amplification, avec une incubation additionnelle de 10 min à 75°C à la fin du dernier cycle. Les produits PCR furent conservés à -20°C jusqu'à leur analyse sur gel d'agarose de 1,5% dans du tampon Tris-acétate-EDTA (TAE : 40 mM de base Tris, 25 mM d'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique) et 20 mM d'acide acétique) supplémenté de $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium (Sigma). L'électrophorèse a été réalisée avec un système de mini-gel (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Californie, USA) sur une période de 30 min à 120 volts. Les gels ont été

photographiés sous lumière U.V. et l'intensité des bandes numérisées analysée à l'aide du densitomètre Chemilmager 5500™ (Alpha Innotech, Californie, USA).

Tableau 2.1 Séquence des amorces utilisées pour la PCR.

ARN	Séquence	Nb cycles	Nb pb	Référence
18S	Sens: cggctaccacatccaaggaa Anti-sens: gctggaattaccgcggt	25	--	Fujita <i>et al</i> , 2005
GATA4	Sens: ctgtcatctcactatgggca Anti-sens: ccaagtccgagcaggaattt	30	248	Makino <i>et al</i> , 1999
Tpn I	Sens: agatggaacgagaggcagaa Anti-sens: ccttcttcacctgcttgagg	33	356	---
aP2	Sens: ccgcagacgacagga Anti-sens: ctcatgcccttcataaact	30	177	Fujita <i>et al</i> , 2005
PPAR γ	Sens: ccagagtctgctgatctgcg Anti-sens: gccacctcttgctctgctc	27	217	Fujita <i>et al</i> , 2005

2.5 Immunoprécipitation et immunodétection de type Western

2.5.1 Extraction des protéines cellulaires et immunoprécipitation

Les cellules ont été rincées et récoltées par raclage avec un policeman, dans 1 mL de PBS supplémenté de 50 mM NaF et 2 mM vanadate de sodium par pétri de 100 mm de diamètre. Les cellules ont été sédimentées à 1000 g durant 1 min à température ambiante. Le culot cellulaire a été resuspendu dans six volumes de tampon de lyse RIPA (150 mM NaCl, 1% v/v Nonidet-40, 0,5% v/v désoxycholate, 0,1% dodécylsulfate de sodium (SDS), 50 mM Tris, pH 7,6) additionné de NaF, de vanadate de sodium et du cocktail I d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les suspensions résultantes ont été incubées sur glace pendant 30 min tout en étant vortexées pendant 10 sec à toutes les 5 min durant cette période, puis centrifugées à 10 000 g pendant 10 min à l'aide d'une microcentrifugeuse Eppendorf 5415C. Les surnageants finaux (lysats de protéines totales) ont été récupérés, dosés pour le contenu protéique par la méthode microBCA (section 2.5.2), et congelés à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure. Le lysat cellulaire (composé de 100 µg de protéines dans 100 µL de tampon) a été éclairci par l'ajout de 0,25 µg de l'anticorps IgG secondaire (ici, anti-IgG de chèvre) (Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, Californie, USA) suivi de 20 µL de suspension de billes de protéines A/G-Plus-agarose (25% v/v) (Santa Cruz Biotechnologie). Après incubation de 30 min à 4°C sous agitation douce, le mélange a été centrifugé à 1000 g durant 30 sec à 4°C puis le surnageant a été incubé avec 2 µg de l'anticorps IgG de chèvre, anti-TpnI (Santa Cruz Biotechnologie) durant 1 h à 4°C. Par la suite, 20 µL de billes de protéines A/G-Plus-agarose ont été ajoutés et le tout incubé sous agitation douce pendant 18 h à 4°C. Les complexes billes-anticorps-antigène ont été récoltés, soumis à trois cycles de lavage (PBS additionné de NaF et vanadate de sodium) et de centrifugation à 1000 g 30 sec à 4°C. Le

culot à été mélangé avec 20 μ L de tampon d'échantillon (Laemmli, 1970) 2X pour électrophorèse pour dissocier le complexe immun et 5 μ L du mélange ont été déposés sur un gel d'électrophorèse de 12% de polyacrylamide puis soumis à toute la procédure d'immunodétection Western (section 2.5.3 – 2.5.5).

2.5.2 Dosage des protéines

La méthode de micro-dosage à l'acide bicinchoninique (BCA; Pierce, Rockford, Illinois, USA) a été utilisée pour le dosage des protéines de lysats cellulaires totaux parce qu'elle n'est pratiquement pas affectée par la présence de détergents. Le réactif BCA est préparé selon les recommandations du manufacturier. Pour le dosage, 1 mL du réactif a été additionné à 1 mL d'échantillon ou d'étalon, le tout incubé durant 1 h à 60°C puis lu en absorbance à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU-6 (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). Des concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) allant de 0 à 40 μ g/mL ont été utilisées comme étalons.

2.5.3 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les échantillons ont été mélangés à du tampon d'échantillon (TE) (Laemmli, 1970) afin d'obtenir une concentration finale de 10 à 40 μ g de protéines dans 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% v/v glycérol, 2% p/v SDS, 5% v/v β -mercaptoéthanol et 6,25% p/v bleu de bromophénol, bouillis pendant 5 min, centrifugés à l'aide d'une microcentrifugeuse pendant 30 sec, puis chargés sur un gel de 1 mm d'épaisseur et 12% de polyacrylamide. Les échantillons ont migré 90 min à 150 volts en présence de SDS en utilisant un appareil Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, USA). Un mélange de protéines étalons (Bio-Rad Laboratories) a également été déposé sur gel pour la calibration des poids moléculaires.

2.5.4 Électrotransfert en mode semi-sec

Après l'électrophorèse, les gels ont été équilibrés durant 5 min dans un tampon de transfert composé de 10 mM Tris, 96 mM glycine (Sigma-Aldrich) et 10% MeOH dans l'eau distillée. Les gels ont été apposés par-dessus une membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF) (Boehringer-Mannheim, Montréal, Québec, Canada) préalablement activée pendant 1 min dans du MeOH et équilibrée pendant 15 min dans du tampon de transfert. Le sandwich gel-membrane a été placé dans le système d'électrotransfert *semi-dry* (The W.E.P. Company, Seattle, Washington, USA) et le transfert des protéines du gel vers la membrane effectué pendant 75 min à 1 mA/cm² (~ 80 mA/gel).

2.5.5 Immunobuvardage

Après électrotransfert des protéines, les membranes de PVDF ont été bloquées dans un tampon Tris salin (TBS : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6) contenant 3% de lait écrémé (Carnation), 0,1% v/v Tween-20 (Sigma-Aldrich) et ce, durant 18 h à 4°C sous agitation douce. Après blocage, les membranes ont été lavées avec une solution de TBS contenant 0,1% v/v de Tween-20 (TBS-Tw), pendant 1 h sous agitation douce avec renouvellement de la solution de lavage aux 15 min. Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dilué 1/1000 (IgG de chèvre anti-Tpnl, Santa Cruz Biotechnologie) durant 1 h à température ambiante et sous agitation douce. Les membranes ont été rincées au TBS-Tw puis incubées avec un anticorps secondaire dilué 1/10000 (anti-IgG de chèvre, Biosource International, Camarillo, Canada) conjugué à la peroxydase du raifort (POD), pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce. Les membranes ont été rincées à nouveau avec du TBS-Tw et traitées pour la détection des complexes anticorps-antigène par chimioluminescence. Pour ce faire, les membranes ont été incubées pendant 1 min dans le réactif de la trousse Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) et exposées contre un film Fuji Medical X-ray (Fuji Photo Film®, Tokyo, Japon). Les films ont été numérisés à l'aide du densitomètre Chemilmager 5500™.

2.6 Analyse immunologique de SSEA-1

2.6.1 Immunocytofluorescence indirecte en microscopie

Les cellules P19 furent mises en culture pour 48 h sur des lamelles de verre gélatinisées (0,1% de gélatine de porc) puis fixées par une incubation de 20 min dans du PBS contenant 4% p-formaldéhyde. Les cellules furent rincées trois fois avec du PBS et conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Toutes les étapes subséquentes furent effectuées à température pièce. Les cellules fixées furent perméabilisées par une solution de PBS contenant 0,005% de saponine pour 30 min, bloquées avec une solution de PBS contenant 0,005% de saponine et 3% de sérum de cheval (Gibco BRL) pendant une heure, puis incubées avec l'anticorps primaire dilué 1/1000 (IgM de souris anti-SSEA-1, Developmental Studies, Hybridoma Bank) dans la solution de blocage. Les cellules furent lavées avec du PBS trois fois et incubées pendant une heure, à la noirceur, avec l'anticorps secondaire anti-IgM de souris conjugué à la fluorescéine (Organon Teknika Co.) et dilué 1/10 dans la solution de blocage. Les cellules furent de nouveau lavées et incubées 15 min avec de l'iodure de propidium 20 µg/mL dans du PBS (Sigma) pour marquer les noyaux cellulaires. Après lavage, la lamelle a été humidifiée par l'ajout de PBS contenant 50% de glycérol et montée sur une lame pour être analysée avec un microscope inversé Zeiss (Zeiss IM, Carl Zeiss, Jena, Allemagne) équipé d'objectifs à contraste de phase, d'un filtre à

fluorescence pour la fluorescéine et d'une caméra numérique. Les photos furent traitées avec le logiciel Northern Eclipse 6.0 et montées avec le logiciel Adobe Photoshop.

2.6.2 Analyse de SSEA-1 au cytomètre de flux

Les cellules P19 indifférenciées furent dissociées avec une solution de trypsine-EDTA (0,025%-1 mM) et les cellules en agrégats furent dissociées avec une solution Accumax (Innovative Cell Technologie Inc., San Diego, Californie, USA). Les étapes subséquentes ont été effectuées à température pièce. Les cellules individualisées furent fixées par incubation d'une heure dans du PBS contenant 1% de p-formaldéhyde, lavées trois fois dans du PBS et incubées pour 15 min avec l'anticorps primaire dilué 1/50 (IgM de souris anti-SSEA-1) dans du PBS additionné de 3% de BSA. Les cellules furent lavées trois fois dans du PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire dilué 1/500 (anti-IgM de souris conjugué à la fluorescéine, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) dans le même tampon PBS-BSA. Les cellules furent lavées trois fois au PBS puis quantifiées par cytométrie de flux à l'aide d'un FACS Calibur équipé du logiciel d'analyse de données CellQuestPro (BD Biosciences, Mississauga, ON).

2.6.3 Rétention immunomagnétique de cellules P19 SSEA-1-positives

Les cellules P19 indifférenciées furent dissociées par un traitement à la trypsine-EDTA (0,025%-1 mM) pendant 5 min à 37°C. Cinq millions de cellules furent incubés avec l'anticorps primaire anti-SSEA-1 (IgM de souris) dilué 1/100 dans le tampon de séparation composé de PBS additionné de 2 mM EDTA et de 0,5% BSA et ce, dans un volume final de 100 µL. L'incubation a duré cinq minutes à température pièce sous agitation. Par la suite, les cellules furent lavées deux fois avec 10 volumes de tampon de séparation et centrifugées pendant 2 min à 300 g. Le culot de la dernière centrifugation a été repris dans 80 µL de tampon de séparation auquel fut ajouté un volume de 20 µL de microbilles magnétiques couplées à un anticorps anti-IgM de souris (Miltenyl Biotec, Sunnyvale, CA). Les cellules ont été incubées durant 15 min entre 6 et 12°C sous agitation, lavées et centrifugées deux fois comme décrit précédemment et le culot final repris dans 500 µL de tampon de séparation. La suspension cellulaire a été déposée sur une colonne Magnetic Cell Sorting LS (Miltenyl Biotec) pré-lavée avec 3 mL de tampon de séparation. Le contenu de la colonne fut rincé trois fois avec 3 mL de tampon de séparation afin de recueillir les cellules non-absorbées sur les billes (fraction SSEA-1^{NEG} #1). Ensuite, cette fraction négative fut centrifugée, le culot repris dans 500 µL de tampon de séparation et repassé sur la colonne. La fraction non retenue après lavage fut appelée fraction SSEA-1^{NEG} #2. Finalement, la colonne fut retirée de l'aimant pour permettre l'élution des cellules fixées sur les microbilles (SSEA-1^{POS}). L'élution a été faite en déposant 5 mL de tampon de séparation dans la

colonne et en provoquant une évacuation forte et rapide du contenu de la colonne à l'aide de l'éjecteur fourni par le fabricant.

2.7 Analyse statistique

Les données sont présentées comme moyenne \pm écart-moyen. Les comparaisons entre deux groupes de données différents ont été faites par le test de Student (*t-test*) après s'être assuré de la normalité de la distribution et de l'égalité des variances. Le logiciel utilisé fut JMP IN 3.2.6 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Une différence de $P < 0,05$ fut considérée comme significative.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

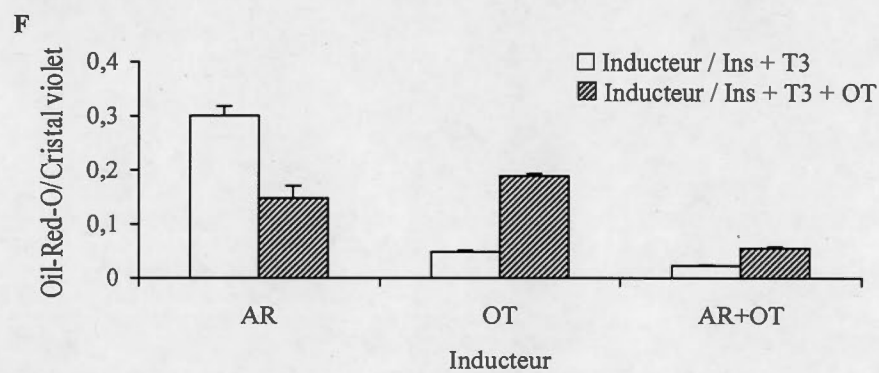
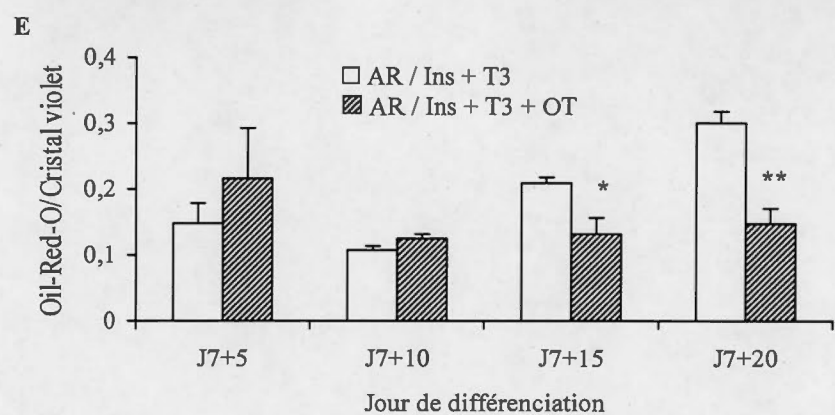
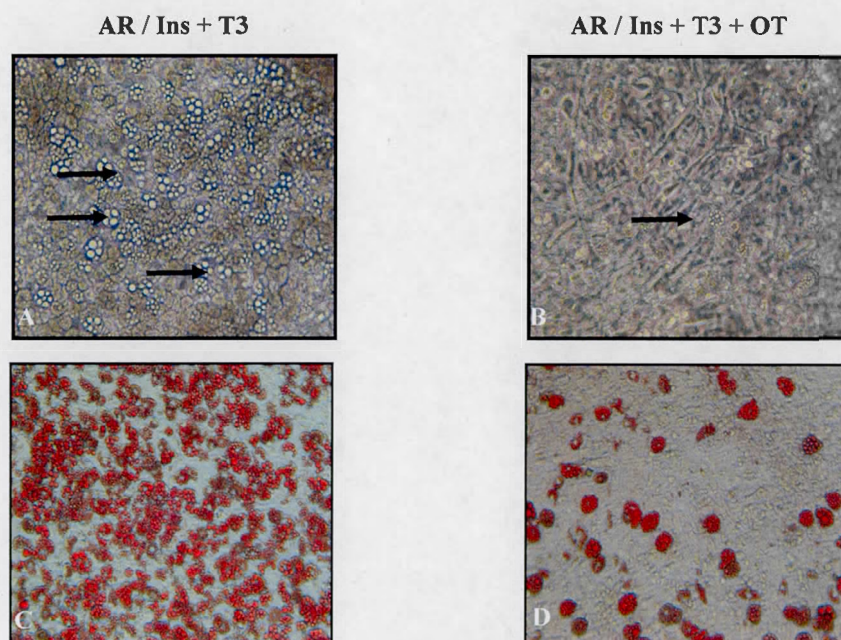
3.1 Génération d'adipocytes à partir de cellules P19

3.1.1 Génération d'adipocytes en absence et en présence d'OT

Les cellules P19 ont été soumises au protocole adipogénique établi avec des cellules souches embryonnaires, lequel comporte deux étapes : (1) 7 jours d'agrégation en présence de 10^{-6} M d'AR comme inducteur, et (2) 20 jours post-agrégation en présence d'Ins et de T3 comme agents de maturation. À la fin du protocole (J7+20), les cultures ont été examinées au microscope pour y observer la présence du phénotype adipogénique qui est caractérisé morphologiquement par la présence d'inclusions lipidiques dans le cytoplasme. La figure 3.1A montre la présence de cellules exhibant de telles inclusions dans les cultures P19. Lorsque de l'OT est ajoutée à une concentration de 10^{-7} M dans le milieu de maturation adipogénique (Ins + T3), il y a réduction du nombre d'adipocytes dans les cultures (figure 3.1B). Les cultures de jours J7+20 furent soumises à une coloration à l'Oil-Red-O, un marqueur des triglycérides. Les figures 3.1C et D montrent une coloration rouge abondante dans les cultures non-traitées avec l'OT et une coloration réduite en présence d'OT. La quantification spectrophotométrique de la coloration durant la différenciation (figure 3.1E) montre une augmentation soutenue des triglycérides lorsqu'il n'y a pas d'OT dans le milieu de maturation. Par contre, en présence d'OT, la quantité de triglycérides semble plafonner dès le 10^e jour post-agrégation et au jour J20, la coloration est deux fois moindre qu'en absence d'OT. Les mesures de coloration à l'Oil-Red-O sont rapportées sur les mesures de coloration au cristal violet pour corriger d'éventuelles différences dans le nombre de cellules entre les cultures. Cependant, ces différences se sont révélées non significatives (données non montrées). On observe une coloration à l'Oil-Red-O relativement élevée au jour J7+5 de la différenciation dans les deux traitements. Il est possible que le colorant soit retenu non spécifiquement dans les agrégats dans les conditions de non-étalement cellulaire. À ce stade, il n'y a pratiquement pas de cellules à inclusions lipidiques dans les cultures et les agrégats ne sont pas encore étalés en tapis cellulaire.

Des variantes au protocole adipogénique ont été réalisées dans le but de déterminer quel effet l'OT peut avoir sur l'adipogénèse s'il est employé durant la période d'agrégation (induction). Une quantification des triglycérides par le colorant Oil-Red-O fut effectuée et les résultats sont présentés à la figure 3.1F. Cette figure montre tout d'abord les valeurs obtenues avec l'AR, l'inducteur adipogénique normalement utilisé; la présence d'OT dans le milieu de maturation diminue la coloration à l'Oil-Red-O tel que déjà montré à la figure 3.1E. Si l'OT est utilisé comme agent

Figure 3.1 Différenciation adipogénique des cellules P19 en absence et présence d'OT. Des cellules P19 ont été cultivées en agrégats suspendus pendant 7 jours (2 jours en gouttes pendantes sans agent inducteur + 3 jours en grand volume en présence de 10^{-6} M d'AR + 2 jours en grand volume en absence d'inducteur), puis en culture adhérente pendant 20 jours en présence des agents adipogéniques Ins et T3. L'OT (10^{-7} M) a été ajoutée durant la période post-agrégation / maturation (A-E), et/ou durant l'agrégation / induction (F). (A,B) Photographie (100X) de cultures prises au jour J7+20 d'une différenciation réalisée avec ou sans OT durant la période de maturation. Les flèches (→) pointent vers des adipocytes reconnaissables par leur contenu en gouttelettes lipidiques. (C,D) Coloration des cultures à l'Oil-Red-O. (E) Quantification spectroscopique de la coloration à l'Oil-Red-O pour mesurer l'effet de l'addition de l'OT durant la maturation. Les valeurs, corrigées par la coloration au cristal violet pour tenir compte de la quantité totale de cellules, sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart moyen pour 3 études indépendantes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ par rapport à la condition AR / Ins + T3. (F) Quantification spectroscopique de la coloration à l'Oil-Red-O à J7+20 de la différenciation adipogénique pour mesurer l'effet de l'addition de l'OT durant l'induction et/ou la maturation. Les valeurs (rapportées relativement à la coloration au cristal violet) représentent la moyenne \pm écart moyen de 3 déterminations pour une étude.



inducteur à la place de l'AR, une chute drastique de l'intensité de la coloration est observée. Le maintien d'OT dans le milieu de maturation adipogénique montre une augmentation de la coloration. Si le milieu d'induction est composé à la fois d'AR et d'OT, l'intensité de coloration est encore plus faible qu'avec l'inducteur OT. Ici, encore, le maintien d'OT dans le milieu de maturation montre une augmentation de la coloration. Les mesures de coloration à l'Oil-Red-O sont rapportées sur les mesures de coloration au cristal violet pour corriger d'éventuelles différences dans le nombre de cellules entre les cultures. Cependant, ces différences se sont révélées non significatives (données non montrées). Les résultats morphologiques montrent donc que les cellules P19 peuvent se différencier en adipocytes et que l'OT, ajouté pendant la période d'induction ou pendant la période de maturation, diminue le rendement adipogénique.

3.1.2 Analyse de PPAR γ et aP2 dans les cultures P19 soumises au protocole adipogénique

Pour déterminer que la coloration à l'Oil-Red-O est bien due à la génération d'adipocytes et non à une simple modification du métabolisme lipidique, les cultures ont été analysées pour l'expression de marqueurs adipocytaires. Pour ce faire, les variantes suivantes du protocole de différenciation adipogénique ont été analysées parce qu'elles ont donné les meilleurs rendements adipogéniques : AR / Ins + T3 et AR / Ins + T3 + OT. La figure 3.2 montre l'analyse RT-PCR de PPAR γ , un facteur de transcription adipocytaire, à différents temps de la différenciation adipogénique, en absence et en présence d'OT dans le milieu de maturation. L'ARN 18S a servi d'étalon interne de toute la procédure d'analyse. En absence d'OT, de faibles niveaux de PPAR γ sont observés au jour J7+5 de la différenciation adipogénique ; les niveaux augmentent par la suite de façon continue jusqu'au jour J7+20, le dernier jour analysé. Les faibles niveaux de PPAR γ à J7+5 viennent appuyer l'explication donnée à la section précédente concernant la réponse positive à l'Oil-Red-O à ce stade de la différenciation. La présence d'OT réduit la régulation à la hausse de PPAR γ sans toutefois inhiber complètement l'expression du gène. La réduction du gène est particulièrement importante au jour J7+20, montrant une inhibition de l'ordre de 70% par rapport à la différenciation adipogénique en absence d'OT. Ce niveau d'inhibition est similaire à celui obtenu par coloration à l'Oil-Red-O.

Les niveaux d'expression de l'ARNm du transporteur lipidique membranaire aP2 (aussi appelé « FABP 4 ») sont montrés dans la figure 3.3. Comme pour PPAR γ , aP2 est régulé à la hausse dans les cultures exposées à Ins et T3, en absence d'OT. Une tendance est observée, soit l'obtention des bandes moins intenses en présence d'OT, mais la compilation des résultats d'études indépendantes indiquent

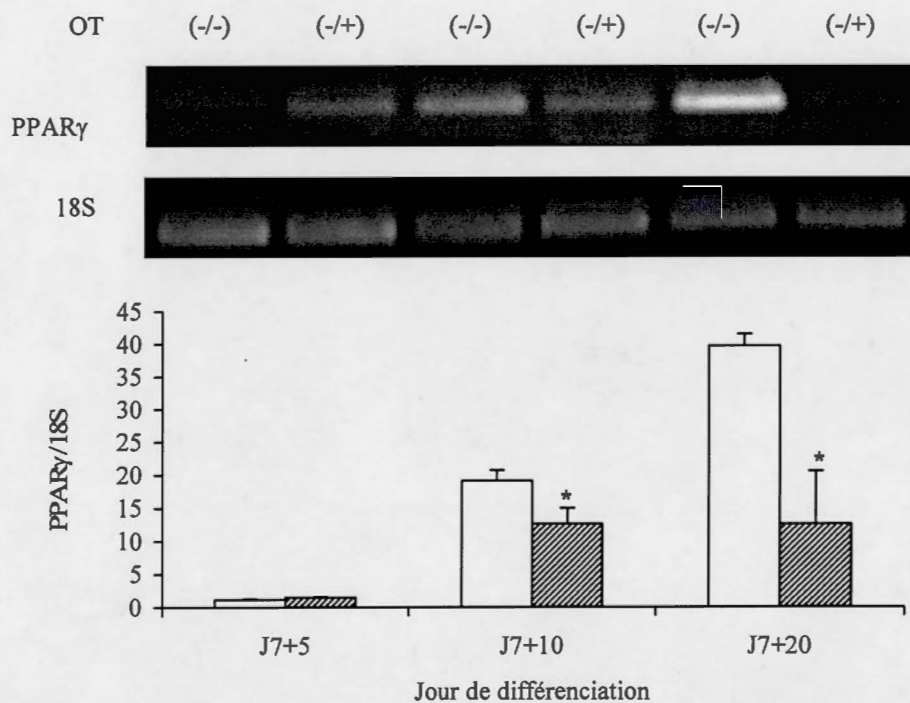


Figure 3.2 Expression de PPAR γ dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes. Les cellules ont été soumises au protocole de différenciation adipogénique en absence (-/-) et en présence (-/+) de 10^{-7} M OT durant la période de maturation. Les résultats RT-PCR sont normalisés par la mesure du niveau d'expression du 18S. Des gels d'agarose 1,5% sont montrés pour une expérience et les valeurs densitométriques (moyennes \pm écarts moyens) sont rapportées pour 3 études indépendantes. *, $P < 0,05$ par rapport à la condition sans OT.

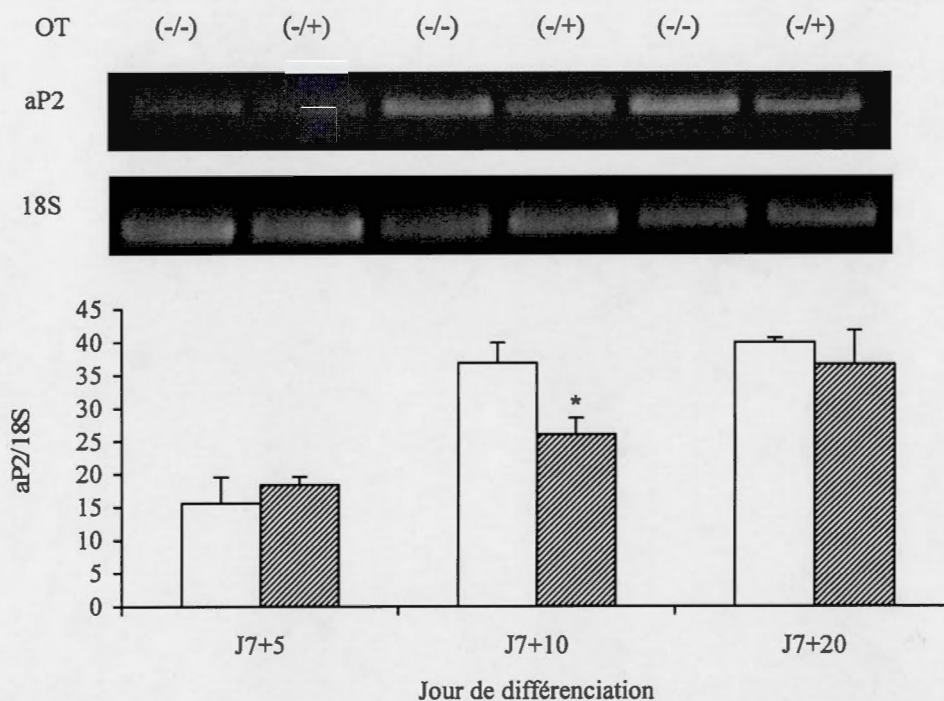


Figure 3.3 Expression d'aP2 dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes. Les cellules ont été soumises au protocole de différenciation adipogénique en absence (-/-) et en présence (-/+) de 10^{-7} M OT durant la période de maturation. Les résultats RT-PCR sont normalisés par la mesure du niveau d'expression du 18S. Des gels d'agarose 1,5% sont montrés pour une expérience et les valeurs densitométriques (moyennes \pm écarts moyens) sont rapportées pour 3 études indépendantes. *, $P < 0,05$ par rapport à la condition sans OT.

une baisse non significative statistiquement au dernier jour d'observation bien que la diminution soit significative au jour J7+10. L'expression d'aP2, contrairement à l'examen morphologique, la coloration à l'Oil-Red-O et l'expression de PPAR γ , ne permet pas de mettre en évidence une action inhibitrice de OT sur l'adipogenèse. Ce fait sera abordé dans la Discussion.

3.1.3 Génération d'adipocytes à partir des cellules souches adultes (MSC)

Des études exploratoires (n=1) ont été réalisées pour évaluer dans quelle mesure l'effet inhibiteur de l'OT sur l'adipogenèse s'applique à des cellules souches embryonnaires seulement ou à d'autres types de cellules souches. Cet aspect a été étudié en utilisant les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse de rat.

Les MSC ont une prépondérance à se différencier en adipocytes lorsque cultivées en présence d'Ins, de Dex et d'IBMX (Miki *et al.*, 2001). La figure 3.4A montre des MSC au jour 15 d'une différenciation adipogénique réalisée en absence et en présence d'OT. Des accumulations de corps gras sont visibles dans les cellules (flèches). La coloration à l'Oil-Red-O, montrée à la figure 3.4B, permet de confirmer la présence d'adipocytes dans ces cultures. La quantification de l'Oil-Red-O par colorimétrie montre qu'en présence d'OT, il y a 50% moins de triglycérides dans les cultures adipogéniques. OT a donc un effet inhibiteur sur l'adipogenèse de cellules souches somatiques en plus de cellules souches de type embryonnaire.

3.2 Les cellules P19 génèrent des cardiomyocytes lorsque traitées avec l'AR, l'Ins et T3

3.2.1 Présence de cellules battantes dans la différenciation adipogénique

Le protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires en adipocytes implique l'utilisation de l'AR et de T3, deux facteurs qui, ont aussi des propriétés cardiomyogéniques (Rudnicki et McBurney, 1987; Rodriguez *et al.*, 1994). De plus, la présence de myocytes fut rapportée dans ces cultures soumises à une différenciation adipogénique (Dani, 1999). Il est possible d'observer des cellules battantes ayant la forme de myofibres, suite à l'utilisation de ce protocole sur les cellules P19. Il est possible d'introduire l'OT dans l'une, l'autre ou les deux étapes du protocole adipogénique. Une étude a exploré dans quelle mesure le moment d'introduction de l'OT pouvait influencer le rendement cardiomyogénique, lequel a été évalué qualitativement par la présence de colonies battantes. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.1. Les conditions du protocole de référence (AR / Ins + T3) génèrent des colonies battantes visibles dans plusieurs champs microscopiques; l'ajout d'OT durant la période post-agrégation / maturation a semblé augmenter ce rendement. Le remplacement de l'AR par 10^{-7} M d'OT amène une diminution du nombre de colonies battantes, lesquelles conservent tout de

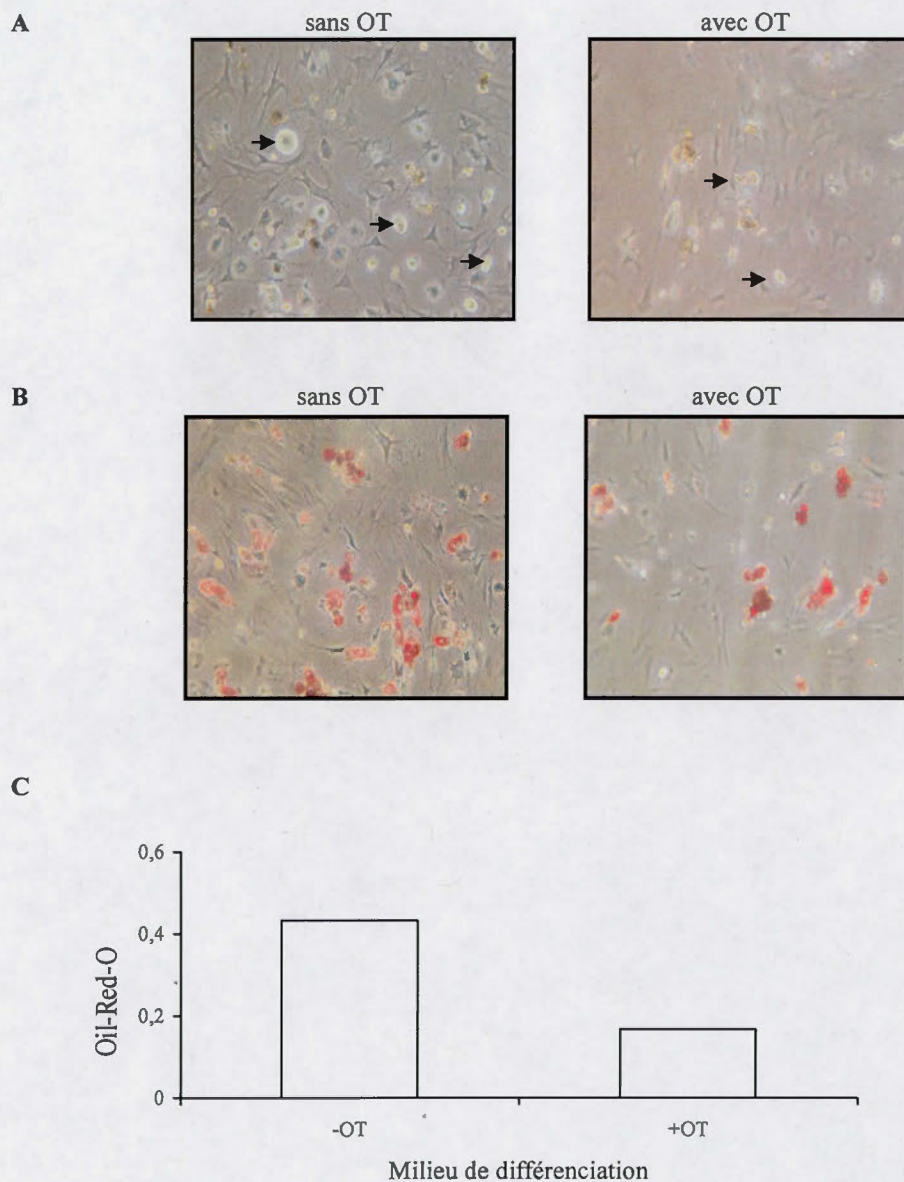


Figure 3.4 Différenciation des MSC en adipocytes. Des cellules ont été soumises au protocole de différenciation adipogénique en absence et en présence de 10^{-7} M d'OT. (A) Photographie (100X) prise au jour 15. Les flèches identifient des cellules avec inclusions lipidiques. (B) Coloration à l'Oil-Red-O au même jour. (C) Dosage de la coloration à l'Oil-Red-O. (n=1)

même la forme de myofibres. Le maintien d'OT durant la période post-agrégation n'a pas d'influence apparente sur ce rendement. La combinaison de l'OT et l'AR durant la période d'agrégation ne génère que peu de colonies battantes et ce rendement demeure à peu près le même qu'il y ait ou non de l'OT dans le milieu de maturation. Dans ces deux cas aussi, les colonies battantes ont la forme de fibres. Bien qu'un nombre de colonies battantes relativement élevé semble être observé dans certains cas, il ne dépasse pas 10-20% du nombre de cellules totales. Il pourrait y avoir des colonies de cellules battantes sous forme d'îlots dans les cultures adipogéniques; ces colonies arrondies seraient difficiles à distinguer à cause de la relative abondance de myofibres battantes.

Tableau 3.1 Rendements cardiomyogéniques de différents protocoles adipogéniques

Agents durant l'agrégation	Agents post-agrégation	Colonies battantes
AR	Ins et T3	++++
AR	Ins, T3 et OT	+++++
OT	Ins et T3	++
OT	Ins, T3 et OT	++
AR et OT	Ins et T3	+
AR et OT	Ins, T3 et OT	+

Les cellules P19 ont été soumises à différentes variantes du protocole adipogénique et l'apparition de colonies de cellules battantes fut évaluée par observation au microscope (100X). AR : acide rétinoïque, OT : ocytocine, Ins : insuline, et T3 : triiodothyronine.

3.2.2 Expression des marqueurs cardiaques GATA4 et TpnI cardiaque dans le protocole adipogénique

La présence de cardiomyocytes dans les cultures adipogéniques a aussi été évaluée par analyse RT-PCR de deux marqueurs cardiaques, GATA4 et TpnI cardiaque. Ces analyses ont été réalisées pour les deux conditions du protocole adipogénique qui ont généré le plus de colonies de cellules battantes, soient AR / Ins + T3 et AR / Ins + T3 + OT. La figure 3.5 montre la présence de l'ARNm du facteur de transcription cardiaque GATA4 dans les cultures P19 soumises au protocole adipogénique en absence d'OT. Son expression diminue continuellement du jour J7+5 au jour J7+20. La réduction est moins importante en présence de 10^{-7} M d'OT dans le milieu de maturation adipogénique. La comparaison de l'intensité des bandes en absence et en présence d'OT montre une augmentation de GATA4 de l'ordre de 40% en présence d'OT tant au jour J7+10 qu'au jour J7+20 (figure 3.5). Cette augmentation n'est cependant pas significative.

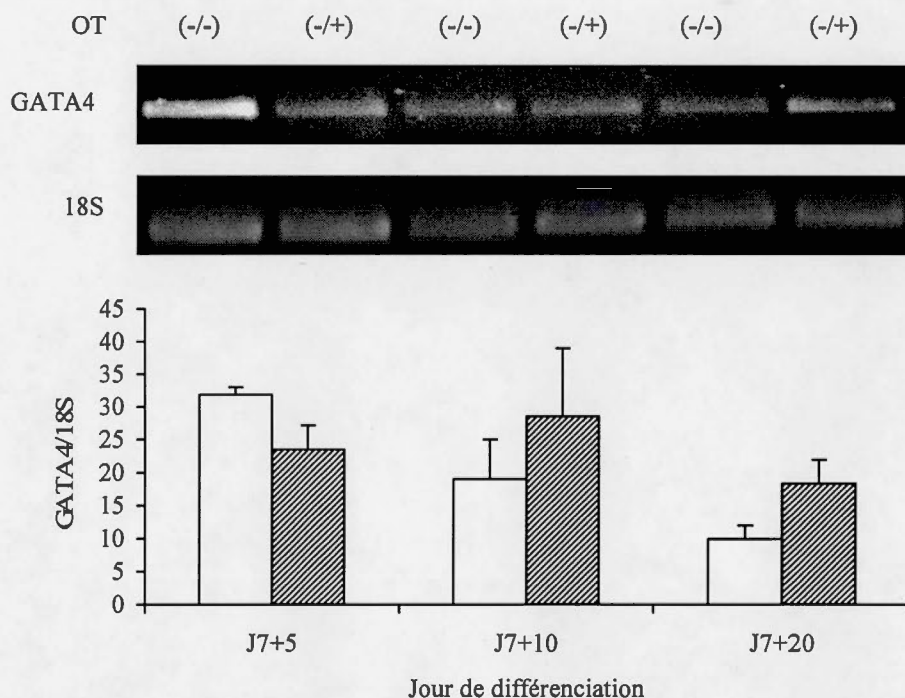


Figure 3.5 Expression de GATA4 dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes. Les cellules ont été soumises au protocole de différenciation adipogénique en absence (-/-) et en présence (-/+) de 10^{-7} M OT durant la période de maturation. Les résultats RT-PCR sont normalisés par la mesure du niveau d'expression du 18S. Des gels d'agarose 1,5% sont montrés pour une expérience et les valeurs densitométriques (moyennes \pm écarts moyens) sont rapportées pour 3 études indépendantes. L'ajout d'OT n'a pas d'incidence statistiquement significative sur l'expression de GATA4.

La figure 3.6 montre les analyses RT-PCR pour l'ARNm de la troponine I cardiaque, un marqueur de cardiomyocytes développés. En absence d'OT dans le milieu de maturation adipogénique, TpnI est détectée dans les cultures durant la période post-agrégation et son expression demeure constante du jour J7+5 au jour J7+20 ($p > 0,05$). Par contre, en présence de 10^{-7} M d'OT dans le milieu de maturation adipogénique on observe une augmentation de l'intensité des bandes aux jours J7+10 et J7+20. De plus, l'expression de la TpnI cardiaque en présence d'OT augmente du jour J7+5 au jour J7+20. Au jour J7+20, le niveau est environ 3 fois plus élevé en présence qu'en absence d'OT.

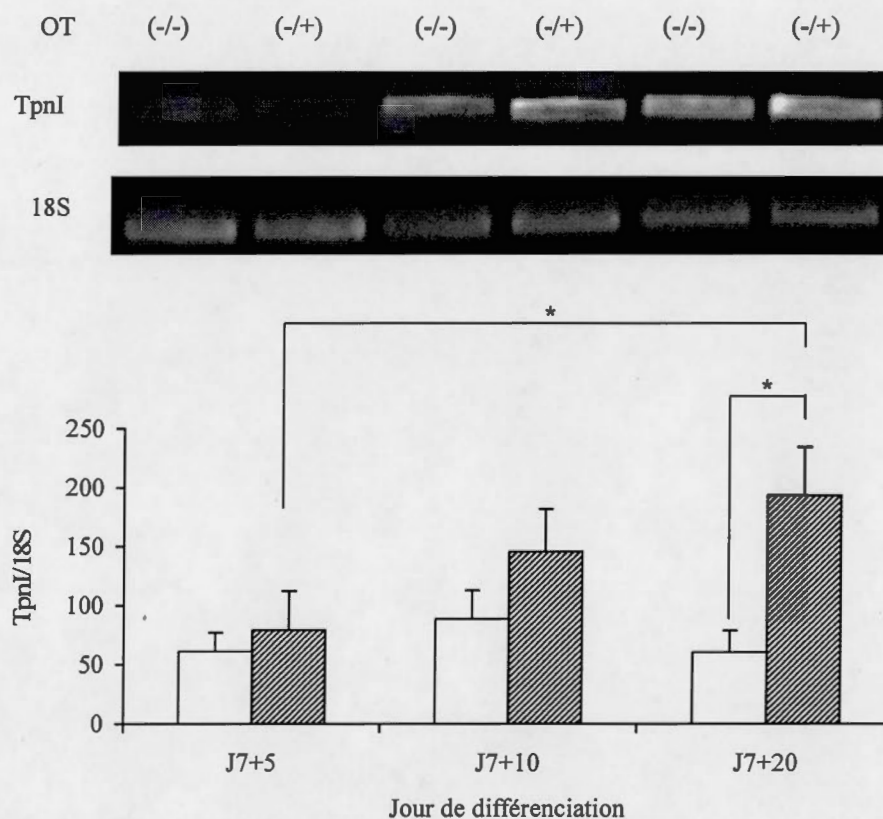


Figure 3.6 Expression de la TpnI cardiaque dans les cultures cellulaires P19 différenciées en adipocytes. Les cellules ont été soumises au protocole de différenciation adipogénique en absence (-/-) et en présence (-/+) de 10^{-7} M OT durant la période de maturation. Les résultats RT-PCR sont normalisés par la mesure du niveau d'expression du 18S. Des gels d'agarose 1,5% sont montrés pour une expérience et les valeurs densitométriques (moyennes \pm écarts moyens) sont rapportées pour 3 études indépendantes. *, $P < 0,05$.

3.3 Différenciation des cellules P19 en ostéocytes

L'OT ayant un effet inhibiteur sur l'adipogénèse et favorisant la cardiomyogénèse, son effet sur une autre différenciation mésodermique, la différenciation en ostéocytes, a été analysé dans une étude exploratoire.

3.3.1 Génération d'ostéocytes P19

Les cellules P19 ont été soumises à un protocole ostéogénique qui ressemble au protocole adipogénique sauf que l'acide ascorbique et le β -glycérophosphate remplacent l'Ins et la T3 durant la période post-agrégative. L'influence de l'ajout d'OT après l'agrégation a aussi été évaluée. Les cultures ont été analysées par la coloration van Kossa, qui marque la minéralisation de la matrice osseuse (Heino *et al.*, 2004). La figure 3.7A montre la morphologie des cellules P19 au jour J5+15 de la différenciation, et en absence et en présence de 10^{-7} M d'OT dans le milieu de maturation. La figure 3.7B montre des sites de minéralisation de la matrice, plus nombreux en absence qu'en présence d'OT dans le milieu de maturation. Afin de quantifier l'influence de l'OT sur la différenciation en ostéocytes, l'activité de la phosphatase alcaline (PA) fut analysée. La figure 3.7C montre le profil temporel du niveau d'activité de la PA des jours J7+5 à J7+15. En absence d'OT, l'activité enzymatique augmente de façon importante de J7+5 à J7+10, puis continue à augmenter jusqu'à J7+15. Ces résultats sont similaires à ceux de la littérature (Lennon *et al.*, 2001). OT diminue cette régulation à la hausse de l'activité enzymatique. Tout comme dans la différenciation des cellules P19 et des MSC en adipocytes, la présence d'OT dans le milieu de maturation inhibe de façon importante bien que non complète la différenciation des P19 en ostéocytes. Par contre, la différenciation des MSC en ostéocytes ne montre pas de différence d'expression de la PA en présence d'OT dans le milieu de différenciation (voir appendice B).

3.3.2 Génération de cardiomyocytes et d'adipocytes dans les cultures d'ostéocytes P19

La figure 3.8A montre la présence de cellules battantes, sous la forme de myofibres dans les cultures de cellules P19 différenciées en ostéocytes. Bien que le nombre de cardiomyocytes soit, selon une évaluation visuelle, très faible, il est tout de même intéressant d'apercevoir des fibres battantes puisque la différenciation en ostéocytes n'implique pas l'utilisation de T3. Le protocole ostéogénique génère aussi des adipocytes (figure 3.8B) en faible quantité. Des myofibres de même que des adipocytes sont aussi présents dans les cultures ostéogéniques en présence d'OT dans le milieu de maturation (non montré). Par contre, la différenciation des MSC en ostéocytes ne permet pas d'apercevoir d'adipocyte et de cardiomyocyte dans les cultures. Les conditions ostéogéniques sont

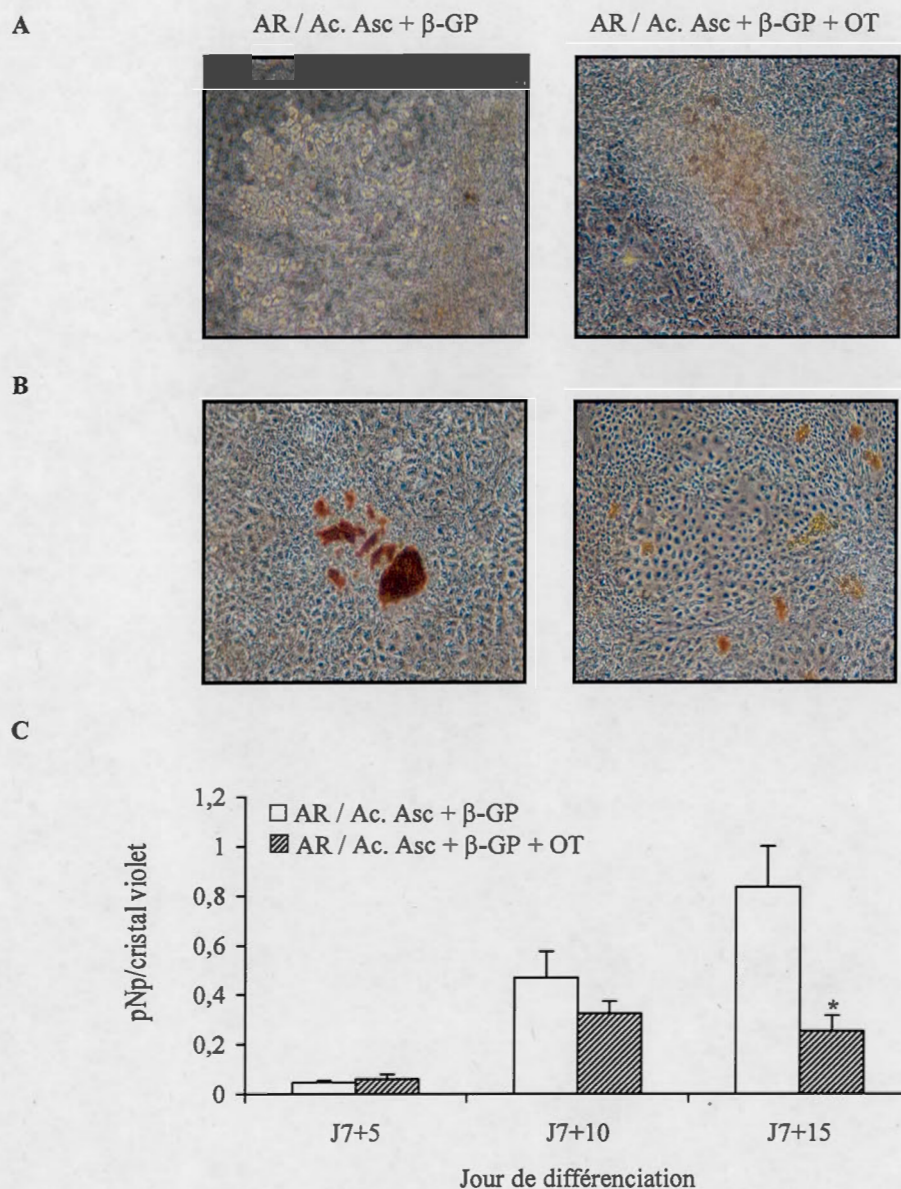
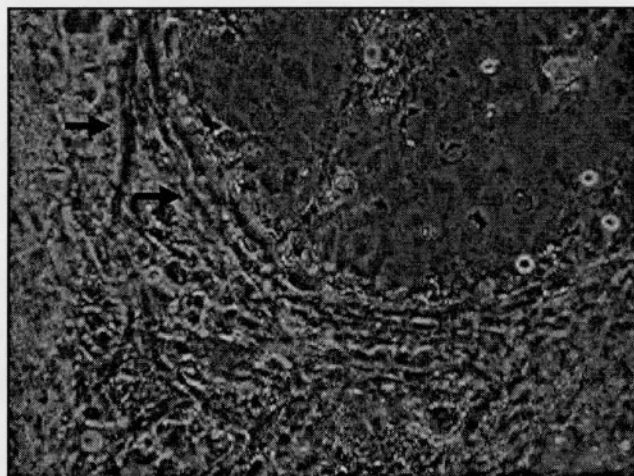


Figure 3.7 Différenciation des cellules P19 en ostéocytes. Des cellules P19 ont été cultivées en agrégats suspendus pendant 7 jours (2 jours en gouttes pendantes sans agent inducteur + 3 jours en grand volume en présence de 10^{-6} M d'AR + 2 jours en grand volume en absence d'inducteur), puis en culture adhérente en présence des agents ostéogéniques acide ascorbique (Ac. Asc) et β -glycérophosphate (β -GP). L'OT (10^{-7} M) a été ajouté ou non durant la période post-agrégation / maturation. (A) Photographie (100X) des cellules P19 au jour 20 post-agrégation. (B) Photographie (100X) des cultures de même jour suite à une coloration van Kossa. (C) Graphique de l'activité de la phosphatase alcaline. Les valeurs sont corrigées par la coloration au cristal violet pour tenir compte de la quantité totale de cellules. *, $P < 0,05$ par rapport à la condition AR / Ac. Asc + β -GP pour des mesures effectuées en triplicata (moyennes \pm écarts moyens) sur une étude de différenciation.

A



B

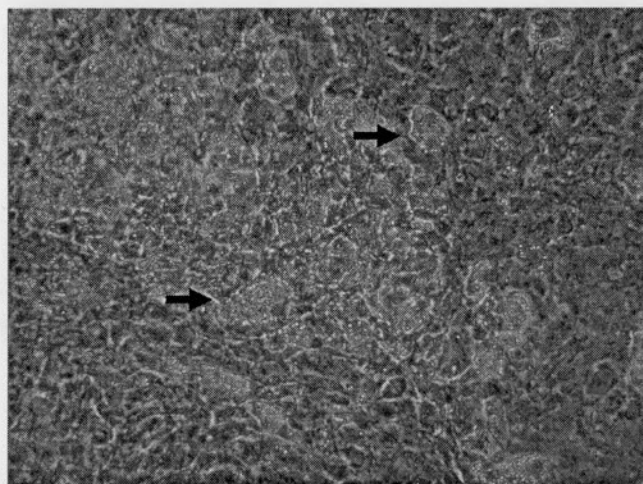


Figure 3.8 Présence d'autres types cellulaires dans les cultures de cellules P19 différenciées en ostéocytes. (A) Photographie (100X) de cellules P19 en J7+20 de différenciation en ostéocytes sans ajout d'OT montrant la présence de cellules battantes (→). (B) Photographie (100X) de cellules P19 en J7+20 de différenciation en ostéocytes sans ajout d'OT montrant la présence d'adipocytes (→). Les battements peuvent être vus sur le CD-ROM annexé.

donc capables de générer divers types cellulaires dérivés du feuillet mésodermique, incluant des cardiomyocytes et des adipocytes. On note que le facteur d'induction est le même pour la différenciation adipogénique et ostéogénique des P19 soit l'AR à la concentration de 10^{-6} M.

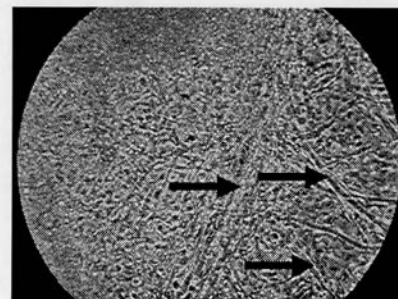
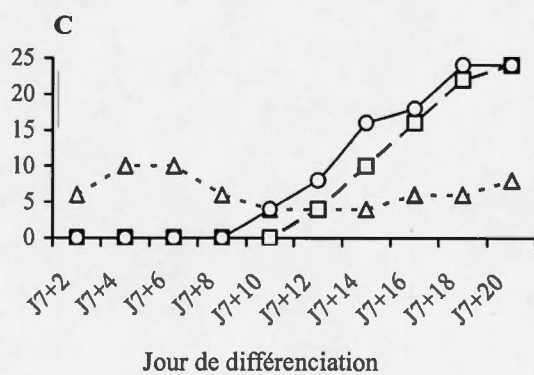
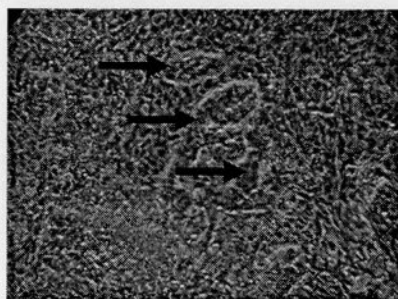
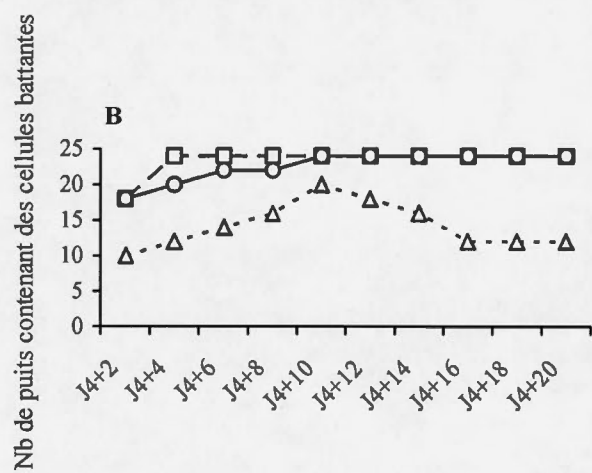
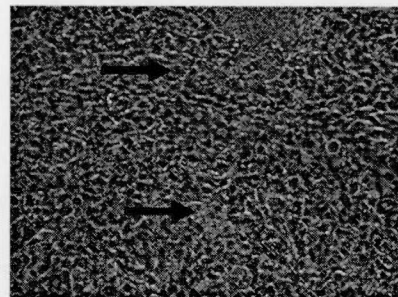
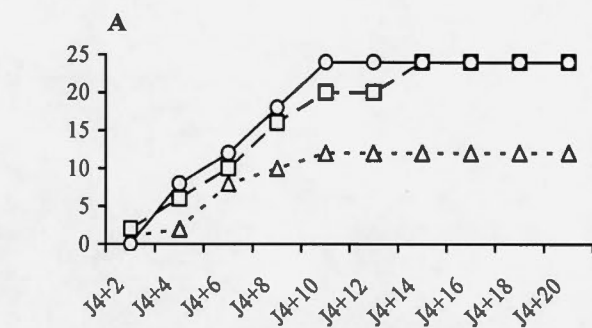
3.4 Rendement cardiomyogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques

Compte tenu de la génération de cellules battantes lors de la différenciation adipogénique, il devenait très pertinent de comparer le rendement cardiomyogénique du protocole adipocytaire et du protocole cardiaque « classique ». D'autre part, comme l'agrégation est initiée en large volume de milieu dans le protocole cardiomyogénique « classique » et en gouttes pendantes dans le protocole adipogénique, la comparaison a englobé aussi un troisième protocole, soit le protocole cardiomyogénique avec gouttes pendantes. Au total, trois études indépendantes ont été réalisées comprenant à chaque fois l'utilisation des trois différents protocoles et, pour chacun, l'ajout ou non de 10^{-7} M d'OT dans le milieu de maturation post-agrégation. De plus, chaque protocole avait sa culture témoin non-induite, c'est-à-dire sans agent inducteur, sans agent de maturation et sans OT. Toutes les cultures ont été réparties dans des plaques tissulaires de 24 puits et menées jusqu'à jour 20 post-agrégation.

3.4.1 Génération de cellules battantes

L'équipe du laboratoire du Dre Paquin démontra en 2002 qu'il était possible de différencier les cellules P19 en cardiomyocytes en utilisant l'OT (10^{-7} M) comme facteur d'induction; le protocole utilisé alors est appelé protocole de différenciation cardiaque « classique ». Différentes variantes de ce protocoles ont été réalisées dans le but d'améliorer les rendements de différenciation en cardiomyocytes. En premier lieu, le temps de maturation a été augmenté passant de 10 jours (J4+10) à 20 jours (J4+20). Les résultats montrent que le nombre de cellules battantes observables au microscope atteint un plateau au jour J4+14 et demeure au même niveau jusqu'à J4+20 (figure 3.9A). En second lieu, 10^{-7} M d'OT a été ajouté aussi au milieu de maturation afin de voir si cette dernière pouvait avoir un effet post-agrégation. La figure 3.9A montre qu'en présence d'OT, le plateau de colonies battantes est atteint un peu plus rapidement, soit au jour J4+10. Étonnamment, des colonies battantes peuvent être observées dans les séries cellulaires non-induites, un résultat différent de celui rapporté par Paquin *et al* (2002). Ce résultat sera discuté plus loin. Il demeure que le nombre de puits contenant des colonies battantes est plus petit (50%) dans les séries non-induites que dans les séries induites.

Figure 3.9 Profil temporel de l'apparition de cellules battantes dans les protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques. Les cellules P19 ont été soumises aux protocoles de différenciation suivants : cardiomyogénique « classique » (A), cardiomyogénique par gouttes pendantes (B) et adipogénique (C). Pour chaque protocole, la courbe des \square est celle du protocole de base, la courbe des \circ est celle du protocole avec ajout d'OT durant la période post-agrégation, et la courbe des Δ est celle du protocole sans aucun agent de traitement (culture non-induite). Toutes les cultures ont été menées jusqu'au jour 20 post-agrégation. Le jour de différenciation est exprimé sous forme $Jb+t$ où b représente le nombre de jour de culture en suspension (pétri bactériologique) et t , le nombre de jours de culture en adhésion (pétri tissulaire). À la fin de l'agrégation, les cellules de chaque culture ont été distribuées dans une plaque tissulaire de 24 puits et examinées tous les deux jours pour comptabiliser le nombre de puits contenant des colonies battantes. De plus, une photographie (100X) montre (\longrightarrow) la présence de cellules battantes dans les cultures en jour $Jb+20$ de différenciation. Les battements peuvent être vus sur le CD-ROM annexé.



La technique des gouttes pendantes, procédure généralement utilisée pour la différenciation des cellules souches embryonnaires, a été utilisée pour les deux premiers jours d'induction avec l'OT afin de déterminer l'effet de la proximité cellulaire. La figure 3.9B montre que le nombre de puits avec des colonies battantes est élevé dès les premiers jours post-agrégation et le plateau est atteint plus rapidement que dans le protocole cardiomyogénique « classique » soit au jour J4+4 en absence d'OT et au jour J4+10 en présence d'OT dans le milieu de maturation. Comme pour le protocole classique, beaucoup de cellules battantes peuvent être observées même en absence d'agent inducteur, atteignant un maximum au jour J4+10.

Tel que démontré précédemment, la différenciation adipogénique permet d'obtenir des cellules battantes. Ces cellules apparaissent à J7+10 en présence d'OT dans le milieu de maturation et à J7+12 en absence d'OT (figure 3.9C). Les cellules battantes observées adoptent la forme de myofibres, contrairement aux colonies battantes observées dans la différenciation « classique » et avec gouttes pendantes qui ont la forme d'îlots arrondis (figure 3.9). Des colonies battantes ont été observées dans les cultures non-induites, mais en quantité moindre que dans les protocoles cardiomyogéniques et sous la forme d'îlots arrondis. La technique de quantification utilisée a ses limites. Ainsi un puits est qualifié positif s'il contient une ou plusieurs colonies battantes. Par contre, la chance de détecter une colonie battante augmente avec l'augmentation du nombre de colonies.

3.4.2 Analyse par RT-PCR de la TpnI cardiaque

L'analyse du rendement cardiomyogénique a été complétée par mesure RT-PCR du gène de la TpnI cardiaque. L'ARNm est fortement exprimé dans les cellules P19 non différenciées, malgré l'absence de cellules battantes (figure 3.10). Une expression de l'ARNm de la TpnI cardiaque dans les cellules P19 indifférenciées fut montrée par l'équipe du Dr Lim (Choi *et al.*, 2004). La figure 3.10 montre une expression similaire de l'ARNm aux jours 10 et 20 post-agrégation dans les cultures non-induites de tous les protocoles, ce qui s'accorde avec la génération spontanée de cellules battantes dans ces cultures (figure 3.9). Dans les protocoles de base cardiaque « classique » et cardiaque avec gouttes pendantes, OT est utilisé comme agent inducteur durant l'agrégation. L'induction avec OT n'augmente pas l'expression de la TpnI comparativement aux cultures non-induites malgré le nombre plus élevé de colonies battantes. Par contre, si le traitement avec OT est maintenu aussi durant la période de maturation, on observe une augmentation de l'expression de la TpnI de 1,4 à 2 fois par rapport au protocole de base. Une telle augmentation est visible 20 jours post-agrégation mais non 10 jours suivant l'agrégation. Les profils d'expression des protocoles cardiaques « classique » et cardiaques

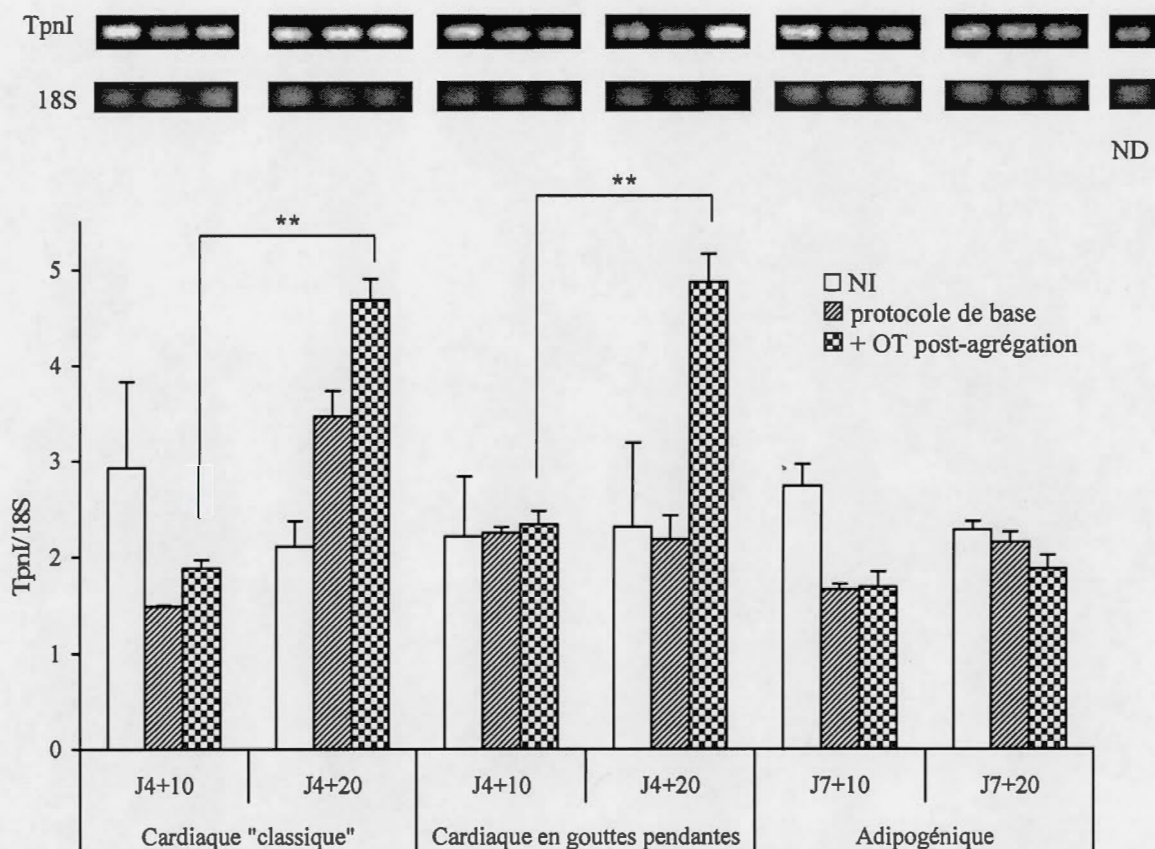


Figure 3.10 Comparaison de l'expression génique de la TpnI cardiaque dans les protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques. Les cellules P19 ont été soumises aux protocoles de différenciation cardiaque « classique », cardiaque avec gouttes pendantes et adipogénique. Pour chaque protocole, il y avait une série de cellules non-induites (NI : □), une série traitée selon le protocole de base (▨) et une série traitée selon le protocole de base et exposée à l'OT durant la période post-agrégation (▩). Le niveau d'expression des cellules non différenciées (ND) est aussi montré. Des gels d'agarose 1,5% sont montrés pour une expérience et les valeurs densitométriques (moyennes ± écarts moyens de 3 études) ont été normalisées relativement au signal de l'ARN 18S. **, $P < 0,01$

avec gouttes pendantes sont similaires lorsque de l'OT est ajoutée au milieu de maturation. Les niveaux d'expression de la TpnI dans le protocole adipogénique ressemblent à ceux des deux protocoles cardiomyogéniques sauf que l'addition d'OT post-agrégation demeure sans influence. L'OT fut démontrée comme étant cardiomyogénique dans les cellules P19 lorsqu'utilisée comme facteur de différenciation durant la période d'agrégation (Paquin *et al*, 2002). Les résultats de cette étude montrent que le maintien d'OT pendant la période post-agrégation augmente le rendement cardiomyogénique.

Afin de vérifier si la même chose est observée au niveau protéique, une immunoprécipitation suivie d'une analyse par immunobuvardage de la TpnI cardiaque a été réalisée pour une étude. L'immunoprécipitation de la protéine fut effectuée puisque le niveau d'expression de la TpnI cardiaque dans les cultures est trop faible pour être détectée sans immunoprécipitation. Parce que l'expérience n'a été réalisée qu'une fois, des conclusions quantitatives sur les rendements cardiomyogéniques sont prématurées. La figure 3.11 montre toutefois la présence de la sous-unité I (29 kDa) de la troponine dans l'ensemble des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques utilisés. De plus, la protéine est aussi fortement exprimée dans les cellules P19 non-différenciées (ND).

3.5 Rendement adipogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques

Puisqu'il est possible de générer des cardiomyocytes dans les conditions adipogéniques, des adipocytes pourraient être obtenus dans des conditions cardiomyogéniques. Les différentes versions des trois protocoles de différenciations ont été examinées pour le rendement en adipocytes en utilisant la coloration à l'Oil-Red-O. Morphologiquement, il n'y a aucune cellule exhibant des inclusions lipidiques dans les différentes versions des deux protocoles cardiomyogéniques (figure 3.12A et B). Au contraire, de telles cellules sont générées dans le protocole de base adipogénique (figure 3.12C) et sont fortement colorées à l'Oil-Red-O (figure 3.12F). Une faible intensité de coloration à l'Oil-Red-O confirme l'absence de cellules au phénotype adipocytaire dans les différenciations cardiaques (figure 3.4D et E). En fait, la coloration rougeâtre n'est observable que dans les zones de fortes densités cellulaires; elle serait retenue non-spécifiquement dans ces zones parce que difficilement délogeable par les lavages.

Une quantification de la coloration a aussi été faite à deux temps de la différenciation et les mesures ont été normalisées par celles de la coloration au cristal violet pour corriger d'éventuelles différences dans le nombre de cellules entre les cultures. Cependant, ces différences se sont révélées non significatives (données non montrées). La figure 3.12G montre une coloration de base (non-

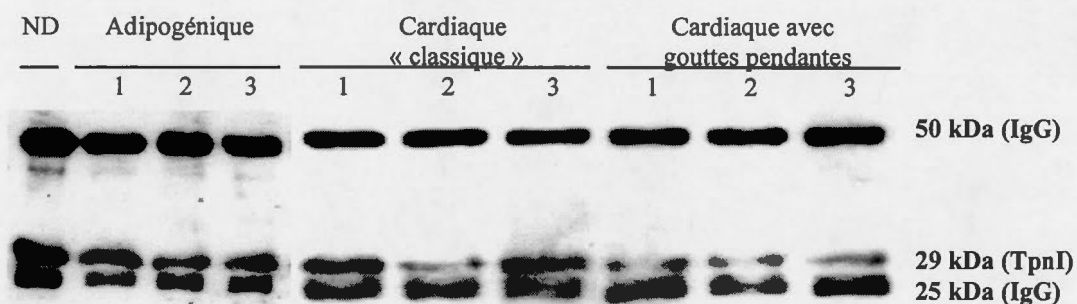


Figure 3.11 Immunodétection de la TpnI dans les cultures P19. La TpnI, immunoprécipitée d'extraits cellulaires, a été analysée par SDS-PAGE et buvardage Western. Les extraits ont été obtenus de cellules non-différenciées (ND) et de cellules à J20 post-agrégation pour les protocoles de différenciation adipogénique, cardiaque « classique » et cardiaque avec gouttes pendantes. Pour chaque protocole, les résultats sont montrés pour la version non-induite (piste 1), la version de base (piste 2) et la version de base avec ajout d'OT pendant la période de maturation (piste 3). Les bandes de la TpnI et des chaînes lourde et légère de l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation sont identifiées.

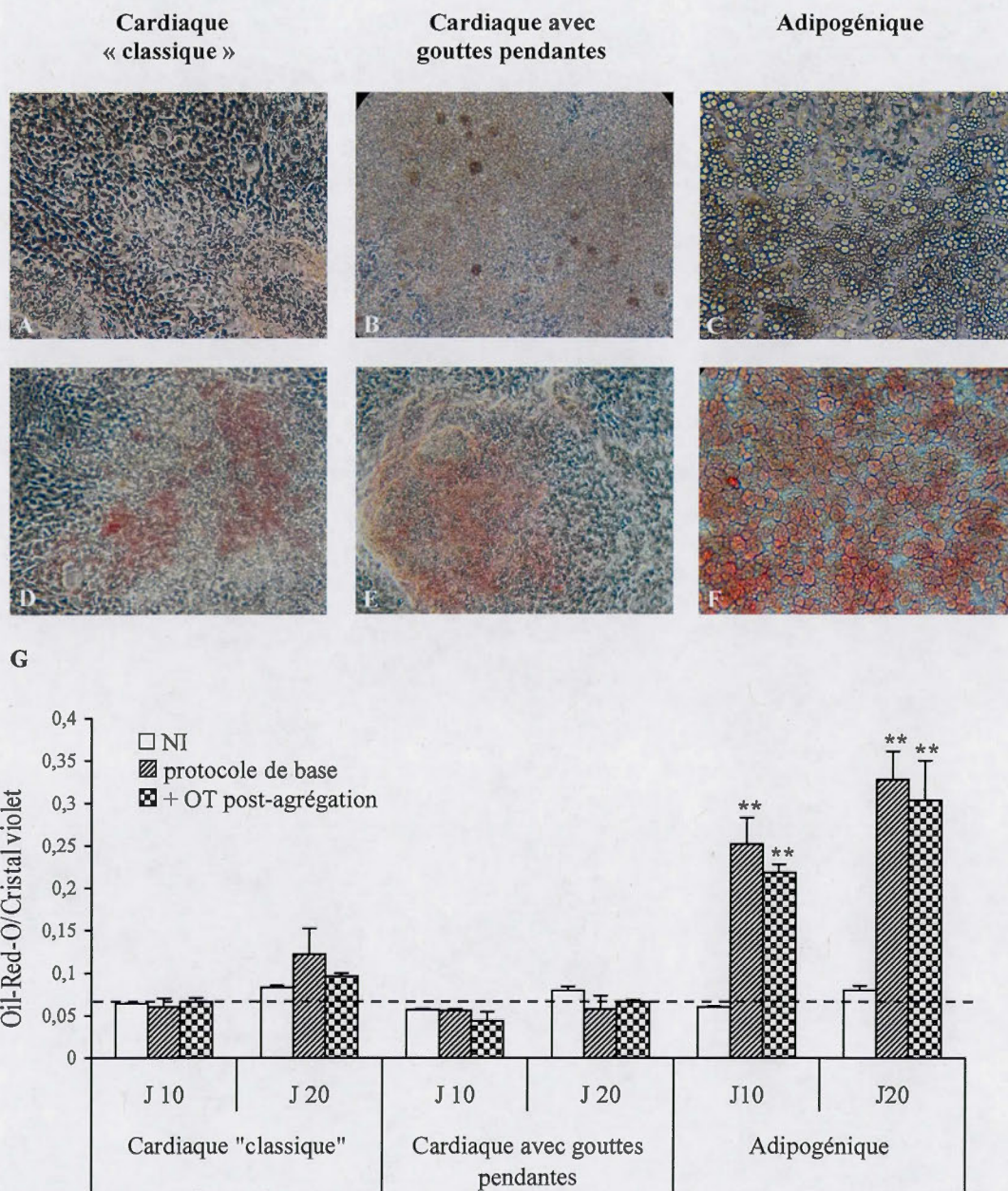


Figure 3.12 Rendement adipogénique des différenciations des cellules P19. Les cellules P19 ont été soumises aux protocoles de différenciation cardiaque « classique » (A, D), cardiaque avec gouttes pendantes (B, E) et adipogénique (C, F). (A à C) Photographies normales (100X) et (D à F) après coloration à l'Oil-Red-O de cultures au jour 20 post-agrégation. (G) Quantification de la coloration à l'Oil-Red-O pour les différentes versions de chaque protocole : sans inducteur (□), protocole de base (▨) et protocole de base avec ajout d'OT post-agrégation (▩). Les valeurs, corrigées par la coloration au cristal violet pour tenir compte de la quantité totale de cellules, sont exprimées sous forme de moyennes \pm écarts moyens pour 3 études indépendantes. **, $P < 0,01$ par rapport à NI.

spécifique) dans tous les protocoles sauf dans le protocole adipogénique, confirmant les observations morphologiques.

Contrairement à ce qui a été observé dans les études présentées au début du chapitre (figures 3.1 à 3.8), ici, l'OT n'a pas d'effet inhibiteur significatif sur la génération d'adipocytes dans le traitement adipogénique. Les résultats contradictoires seraient peut-être dus au choix du sérum de culture. En effet, toutes les études de différenciation des sections 3.1 à 3.3 ont été réalisées avec un FBS inactivé à la chaleur alors que les études des sections 3.4 et 3.5 ont été réalisées avec un FBS non inactivé à la chaleur. Ce dernier FBS avait été sélectionné pour sa capacité à générer plus de cardiomyocytes avec le protocole cardiaque utilisant le DMSO. Un test de l'effet de ce FBS non-inactivé sur les cellules non-induites n'ayant pas été mené parallèlement; il se pourrait que la non-inactivation du sérum explique la différenciation spontanée des cellules non-induites en plus d'expliquer l'absence d'effet d'OT sur l'adipogénèse. Autrement, des lots variés de cellules ont été utilisés pour toutes les sections du travail, et les lots des milieux de cultures et ceux des agents inducteurs ont été les mêmes.

3.6 Études exploratoires de l'expression de l'antigène de l'état non-différencié SSEA-1

3.6.1 Expression de SSEA-1 par les cultures P19 indifférenciées

La différenciation des cellules P19 en cardiomyocytes ne permet pas d'obtenir de très bons rendements en cellules battantes, au plus 20% de toutes les cellules adoptent le phénotype cardiomyocyte. Pour améliorer ce rendement, une purification réalisée de façon précoce durant la différenciation pourrait être effectuée. En effet, s'il reste des cellules indifférenciées après traitement avec des facteurs ou conditions morphogéniques, ces cellules continuent de proliférer à un rythme plus soutenu que les cellules différenciées et envahissent les cultures.

L'antigène de surface SSEA-1 est reconnu pour indiquer l'état indifférencié des cellules P19 et pourrait être utilisé pour séparer les cellules différenciées des cellules indifférenciées dans un triage immunochimique basé sur la sélection positive de cellules SSEA-1⁺. Le SSEA-1 présente un avantage pratique sur d'autres marqueurs de la surface cellulaire; en effet, il résiste à la trypsine de par sa nature glycolipidique. L'expression de SSEA-1 dans les cellules indifférenciées a d'abord été évaluée par microscopie d'immunocytofluorescence. La figure 3.13A présente deux couleurs de fluorescence : le rouge, provenant des molécules d'iodure de propidium intercalées entre les bases de l'ADN cellulaire, permet de détecter toutes les cellules et le vert, provenant de la fluorescence de l'anticorps secondaire, permet de détecter les cellules SSEA-1⁺. Les résultats montrent qu'une forte proportion des cellules expriment SSEA-1 bien que l'expression varie d'une cellule à l'autre. Un tout petit nombre de cellules

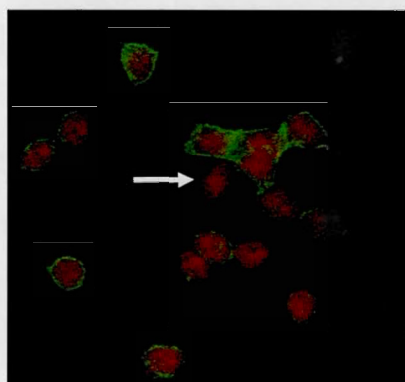
(marquées par une flèche) n'expriment pas ce marqueur de surface. Des résultats similaires ont été obtenus en FACS (figures 3.13B et C).

La capacité du système MACS à retenir les cellules SSEA-1⁺ a ensuite été évaluée. Les résultats de trois études indépendantes montrent que 11% des 5 millions de cellules de départ s'est retrouvé dans la fraction non retenue suite à deux passages consécutifs sur la colonne (figure 3.13C), un pourcentage de cellules SSEA-1⁺ qui s'accorde avec ceux estimés par cytochimie et cytométrie de flux. Les cellules retenues ont été par la suite éluées puis remises en culture afin de s'assurer de leur viabilité et de leur capacité de prolifération. Toutes les cellules ont adhéré et ont proliféré normalement. Les résultats laissent penser qu'il serait possible de dépléter sévèrement, si ce n'est pas à 100%, les cultures P19 de leurs membres indifférenciés.

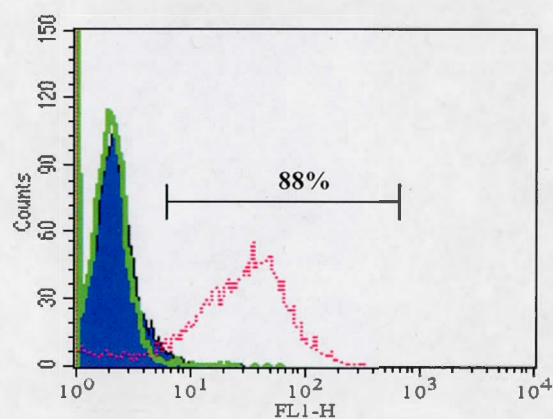
3.6.2 Expression de SSEA-1 par les agrégats

La figure 3.14 illustre la distribution de l'antigène SSEA-1 dans les agrégats de jour 7 en fonction de l'inducteur utilisé lors de l'agrégation. Alors que 88% des cellules indifférenciées et non soumises à l'agrégation (figure 3.13B) expriment l'antigène SSEA-1, il ne reste que 7% de cellules positives après 7 jours d'agrégation en présence de 10^{-6} M d'AR (figure 3.14A). Par contre, lorsque 10^{-7} M d'OT est utilisé comme facteur d'induction durant l'agrégation, le nombre de cellules SSEA-1⁺ est de 20%. Fait intéressant, lorsqu'aucun inducteur n'est ajouté durant l'agrégation, seulement 18% des cellules possèdent encore le marqueur de non-différenciation. L'agrégation elle-même a donc une influence sur l'expression de l'antigène SSEA-1, un résultat qui s'accorde avec l'observation d'une différenciation spontanée dans cette condition. La moyenne géométrique de SSEA-1 après les différents traitements montre que l'absence d'inducteur (non-induit, NI) et l'induction avec l'AR ou l'OT ont une distribution de l'antigène similaire au niveau de la population cellulaire en entier.

A



B



C

Études	% de cellules SSEA-1 ⁺
FACS #1	88%
MACS #1	90%
MACS #2	91%
MACS #3	91%

Figure 3.13 Expression du marqueur de non-différenciation SSEA-1 par les cellules P19 indifférenciées. (A) Fluoromicrographie (320X) de cellules colorées à l'iodure de propidium (rouge) et marquées immunochimiquement à la fluoresceine (vert) pour l'antigène SSEA-1. (B) Profil d'une étude de SSEA-1 au FACS où la courbe en mauve représente la fluorescence basale des cellules, la courbe verte le témoin négatif (marquage avec seulement l'Ac II) et la courbe rose les cellules SSEA-1⁺. (C) Résumé d'études indépendantes évaluant la proportion de cellules SSEA-1⁺ dans les cultures. FACS, cytométrie de flux ; MACS, triage immunomagnétique positif.

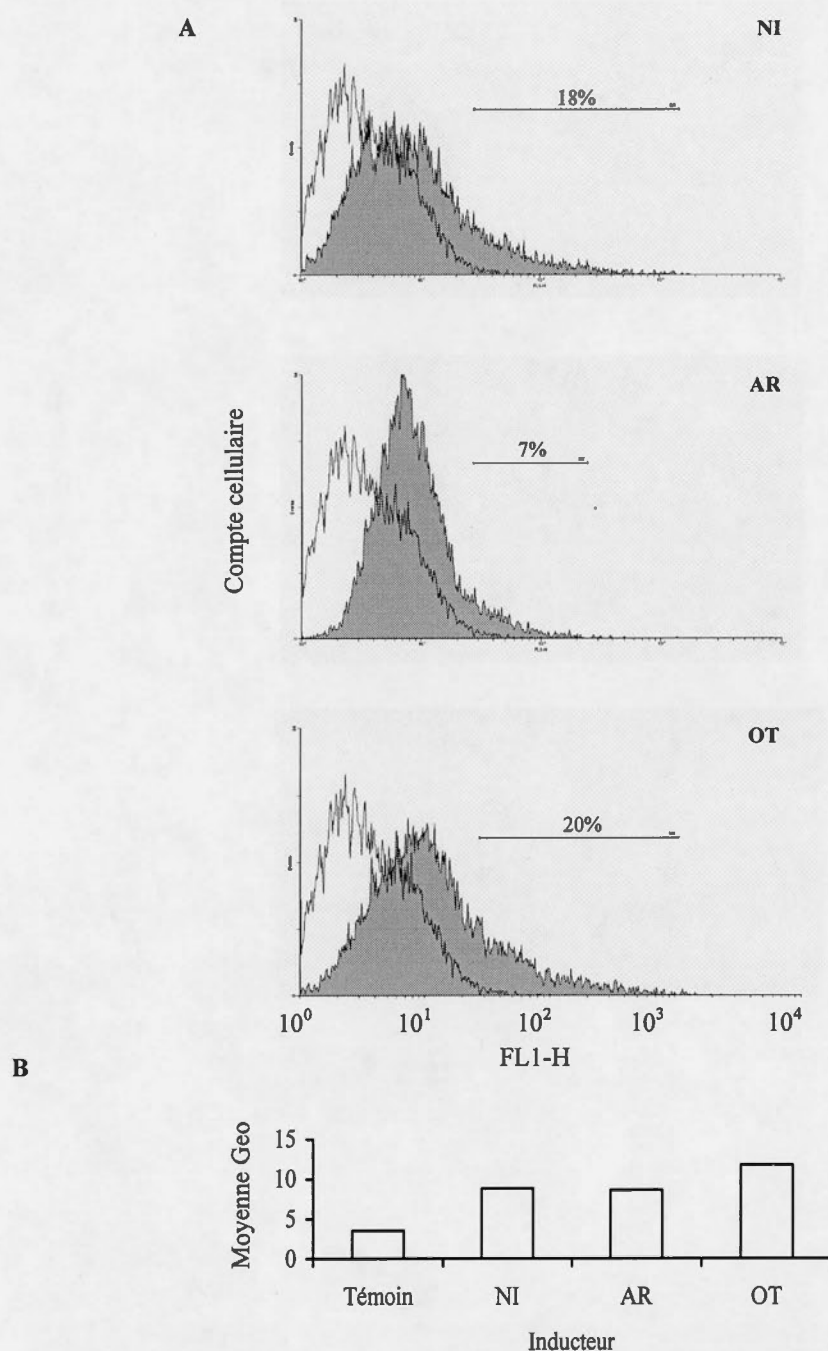


Figure 3.14 Analyse de SSEA-1 par FACS. Analyse de la présence de SSEA-1 sur les cellules P19 agrégées pendant sept jours en absence d'inducteur (NI) ou en présence d'acide rétinoïque 10^{-6} M (AR) ou d'ocytocine 10^{-7} M (OT). (A) Graphique montrant la fluorescence pour 10 000 événements où le pic à surface blanche représente la fluorescence basale des cellules et le pic à surface ombrée les cellules positives pour SSEA-1. (B) Graphique montrant la moyenne géométrique des différentes inductions, le témoin représente la fluorescence basale des cellules.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Depuis quelques années, la littérature scientifique s'accorde pour dire que des cellules souches sont retrouvées dans la quasi-totalité des organes composant l'être humain. La présence de ces cellules permettrait le maintien et la régénération cellulaire de l'organe. Le cœur ne déroge pas à cette règle et possède aussi un réservoir de cellules souches pouvant être différenciées en cardiomyocytes (Beltrami *et al.*, 2003; Matsuura *et al.*, 2004). Toutefois, les cellules cardiaques pourraient être en nombre insuffisant pour permettre la recellularisation de la partie nécrosée du cœur ayant subi un infarctus (Kajstura *et al.*, 1998). Afin de venir en aide aux cellules souches du cœur, les chercheurs ont pensé implanter des cellules souches embryonnaires ou adultes dans la région nécrosée du muscle cardiaque. L'implantation de cellules souches indifférenciées, tant embryonnaires qu'adultes a été envisagée. L'utilisation des cellules souches embryonnaires est associée à un risque de création de tératocarcinome. Les cellules souches adultes indifférenciées ne seraient pas non plus tout à fait inoffensives puisque des recherches ont récemment montré que les MSC ont tendance à se diriger vers les tumeurs en progression pour y favoriser l'angiogénèse (Sun *et al.*, 2005; Udani *et al.*, 2005). Une pré-différenciation de cellules souches en cardiomyocytes avant l'implantation pourrait diminuer le risque de formation de tumeur tout en promouvant un recouvrement de la fonction cardiaque. Cependant le taux de cellules différenciées en cardiomyocytes dans les cultures est faible.

Des efforts sont investis pour différencier, avec un rendement élevé, les cellules souches en cardiomyocytes. Dans cette optique, nous avons utilisé le modèle de cellules souches embryonnaires P19. Des travaux antérieurs avaient montré que l'OT a une action cardiomyogénique dans le modèle P19 et une action anti-adipogénique sur une lignée cellulaire pré-adipocytaire (3T3). Le présent travail a utilisé le modèle P19 pour étudier la différenciation adipogénique, les adipocytes étant dérivés du même feuillet embryonnaire que les cardiomyocytes : le mésoderme. Suite à des modifications du protocole adipogénique par l'ajout d'OT, nous avons évalué le potentiel cardiomyogénique de cette différenciation.

Les principaux résultats présentés dans ce travail sont :

- 1- Les cellules de carcinome embryonnaire P19 sont capables de différenciation en adipocytes et apparemment aussi en ostéocytes.

- 2- En plus de générer le phénotype cellulaire attendu, les protocoles adipogéniques et ostéogéniques génèrent aussi des colonies de cellules musculaires battantes et le protocole ostéogénique donne naissance à des adipocytes.
- 3- Dans les cultures P19, l'OT ajoutée à l'Ins et la T3 dans le milieu de maturation adipogénique réduit le rendement en adipocytes sans aucune diminution sur le rendement en cellules battantes. L'OT réduit aussi l'adipogénèse des MSC mais ne génère pas de cellules battantes. L'action anti-adipogénique de l'OT pourrait être dépendante du sérum et se manifesterait apparemment si la culture se fait dans un sérum inactivé à la chaleur.
- 4- L'expression génique de la TpnI cardiaque ne montre pas de différence entre les protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques sauf dans le cas des protocoles cardiomyogéniques où l'OT est maintenue dans le milieu de culture après la période d'agrégation. Il est donc avantageux de prolonger le traitement des cellules avec l'OT.

4.1 Génération d'adipocytes

Les résultats obtenus quant à la différenciation adipogénique sont divisés en deux groupes : le premier groupe où les cultures furent réalisées avec un sérum inactivé à la chaleur (sections 3.1 à 3.3) et le second groupe où le sérum ne fut pas inactivé à la chaleur (sections 3.4 et 3.5). En ce qui concerne les différenciations du premier groupe, la figure 3.1A montre que les cellules souches embryonnaires P19 peuvent être différenciées en cellules de phénotype adipocytaire montrant la présence d'inclusions lipidiques pouvant être colorées à l'Oil-Red-O (figure 3.1C) et exprimant les ARNm de PPAR γ (figure 3.2) et aP2 (figure 3.3). Les adipocytes apparaissent suite à l'induction des cellules P19 avec 10^{-6} M d'AR lors de l'agrégation et d'une maturation en culture adhérente en présence d'Ins et de T3. L'induction avec l'AR est essentielle à l'adipogénèse, le remplacement de l'AR par l'OT ou la combinaison de l'OT avec l'AR ne générant pas ou peu de cellules à inclusions lipidiques (figure 3.1F). Il est intéressant de noter l'effet inhibiteur de l'OT sur l'action inductrice de l'AR dans l'adipogénèse. L'ajout de 10^{-7} M d'OT au milieu de maturation n'empêche pas la génération de cellules au phénotype adipocytaire (figure 3.1B et D), mais le taux de différenciation / maturation adipogénique est inférieur d'environ 50% à celui observé en absence d'OT, comme le montre la figure 3.1E. L'inhibition causée par l'ajout d'OT au milieu de maturation n'est pas uniquement due à une diminution du métabolisme lipidique et se situe aussi au niveau de l'expression de gènes adipocytaires puisqu'une diminution d'environ 50% de l'ARNm de PPAR γ est observée en présence d'OT (figure 3.2). PPAR γ est un facteur de transcription essentiel et spécifique à l'obtention d'adipocytes tant *in vitro* qu'*in vivo* (Rosen *et al.*, 1999). Une étude sur la différenciation des cellules souches embryonnaires a démontré que l'atténuation de PPAR γ par un ARN interférant inhibe la

différenciation en adipocytes au profit de la différenciation ostéogénique, et ce sans ajout d'agent de différenciation ostéogénique (Yamashita *et al.*, 2006).

L'action inhibitrice de l'OT ne semble pas restreinte qu'à la différenciation des cellules P19 en adipocytes. En effet, les cellules souches adultes MSC se différencient en adipocytes lorsqu'elles sont cultivées en présence d'Ins, de Dex et d'IBMX (Pittenger *et al.*, 1999), et l'ajout de 10^{-7} M d'OT dans le milieu de différenciation inhibe l'apparition du phénotype adipogénique comme le témoigne la réduction de 50% de la coloration à l'Oil-Red-O (figure 3.4). L'effet inhibiteur de l'OT a aussi été remarqué sur des cellules P19 en différenciation ostéogénique comme le montre la figure 3.7. Cette différenciation est similaire à la différenciation adipogénique des P19 mais les agents de maturation utilisés sont l'acide ascorbique et le β -glycérophosphate. Comme dans les différenciations adipogéniques des P19 et des MSC, une inhibition de 50% d'un marqueur ostéogénique, la phosphatase alcaline, a été obtenue en présence d'OT dans le milieu de maturation ostéogénique. Un récepteur à l'OT fonctionnel fut d'ailleurs retrouvé sur des ostéoblastes humains (Copland *et al.*, 1999).

L'OT, tout comme la vasopressine, fut déjà démontrée comme inhibant l'adipogénèse sur des cellules fibroblastiques pré-adipocytaires de la lignée 3T3 (Wilson et Hollenberg, 1987). Malgré le fait que l'OT ait des effets similaires à l'Ins sur les adipocytes en culture (Mirsky et Perisutti, 1962) en stimulant l'activité de la protéine kinase C (Egan *et al.*, 1990), elle possède aussi plusieurs effets contraires comme une diminution du métabolisme des phosphoinositides (Augert et Exton, 1988) ainsi qu'une incapacité à stimuler l'activité de la pyruvate-déshydrogénase et la lipogénèse (Hanif *et al.*, 1982).

Qu'elle soit ajoutée durant la période d'induction (agrégation) ou celle de maturation, l'OT inhibe l'adipogénèse, du moins lorsque les cellules sont cultivées dans un sérum foetal inactivé à la chaleur. Les mécanismes de cette inhibition ne sont pas connus et cela se complique par le fait que les mécanismes de l'adipogénèse sont incomplètement compris. Des travaux ont souligné l'importance de la MAPK Erk dans l'obtention de phénotypes cellulaires adultes. Par exemple, pour l'obtention de neurones à partir de cellules P19, Erk doit être inactivée (i.e. non phosphorylée) dans la période d'agrégation (Enarsson *et al.*, 2002) et activée (phosphorylée) dans la période post-agrégation (Tsujimura *et al.*, 2001). Le contraire est observé lors de la différenciation de cellules souches embryonnaires en adipocytes, soit une phosphorylation de Erk dans la phase précoce et une diminution de la phosphorylation dans la phase tardive (Bost *et al.*, 2002). Une inactivation de Erk est aussi

nécessaire dans la phase tardive de l'ostéogénèse, une autre voie de différenciation mésodermique. Considérant que dans certaines situations ou certains types cellulaires, l'OT est capable d'induire une phosphorylation de la MAPK Erk suite à la liaison à son récepteur (Strakova *et al.*, 1998; Guzzi *et al.*, 2002; Rimoldi *et al.*, 2003; Pequeux *et al.*, 2004), on pourrait expliquer ainsi le rôle inhibiteur de l'OT sur la maturation adipogénique : si l'ajout d'OT dans le milieu de maturation adipogénique (ou ostéogénique) augmente la phosphorylation de Erk, cela pourrait expliquer la diminution de l'obtention d'adipocytes (ou d'ostéocytes) matures. Par contre, une induction avec l'AR est essentielle à l'activation de la voie de signalisation induite par PPAR γ (Lowell, 1999). L'AR induit l'activation de la MAPK Erk et cette voie de signalisation augmente l'expression de PPAR γ . L'effet d'OT sur la phosphorylation d'Erk pourrait être testé dans les modèles P19 et MSC. Les conditions adipogéniques des P19 et des MSC ne sont pas identiques, il serait intéressant de mesurer les rendements en interchangeant ces conditions et les relier aux mesures de phosphorylation de Erk.

L'effet inhibiteur de l'OT sur l'induction de l'adipogénèse par l'AR est plus difficile à expliquer en ne considérant qu'Erk. En effet, l'AR induit l'activation de Erk qui mène à une stimulation de la voie de signalisation responsable de la régulation à la hausse de PPAR γ (Lowell, 1999). En principe, l'OT utilisée durant l'induction adipogénique aurait une action pro-adipogénique en se basant sur sa capacité à activer Erk (Strakova *et al.*, 1998; Guzzi *et al.*, 2002; Rimoldi *et al.*, 2003; Pequeux *et al.*, 2004). Ce n'est pas le cas. En fait, l'OT inhibe même l'action pro-adipogénique de l'AR. Des études ont toutefois rapporté que l'OT induisait différents patrons temporels d'activation de Erk dépendamment que son récepteur se retrouve à l'intérieur ou à l'extérieur de microdomaines cavéolaires (Rimoldi *et al.*, 2003). Les cellules P19 expriment OTR (Paquin *et al.*, 2002) et il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure l'agrégation et l'exposition à l'AR affectent la localisation de ce récepteur. Dans la différenciation cardiomyogénique « classique », l'OT est ajoutée dans la période d'agrégation et génère des cardiomyocytes, phénotype ne nécessitant pas la phosphorylation de Erk dans la phase précoce (Bost *et al.*, 2002). On peut imaginer que l'ajout d'OT dans la période d'agrégation ne permet pas la phosphorylation de Erk dû à la localisation de OTR. L'ajout d'OT dans la période d'agrégation, en même temps que l'AR ou en remplacement de l'AR, agit peut-être comme dans la différenciation cardiomyogénique « classique » et diminue la phosphorylation de Erk, menant à une diminution de l'adipogénèse mais permettant tout de même d'obtenir des cellules battantes. Des analyses temporelles de la phosphorylation de Erk devront être faites pour clarifier l'importance de l'activité de cette MAPK dans les étapes d'induction et de maturation des différenciations effectuées dans ce travail. Des fenêtres temporelles existent non seulement pour Erk mais aussi pour l'AR dans la génération de phénotypes cellulaires différenciés. Ainsi, lorsque l'AR est ajouté dès le jour zéro de l'agrégation, la

production de neurones est privilégiée (Rudnicki et McBurney, 1987; Cadet et Paquin, 2000), si l'AR est ajouté deux jours suivant le début de l'agrégation, des types cellulaires dérivés du mésoderme sont plutôt obtenus (Kawaguchi *et al.*, 2005).

4.2 Génération de cardiomyocytes avec les traitements adipogéniques

Outre l'OT, plusieurs substances furent montrées comme étant cardiomyogéniques sur les cellules P19. Parmi celles-ci, on compte l'AR lorsqu'utilisé à la concentration de 10^{-7} M (Rudnicki et McBurney, 1987) et la T3 lorsqu'utilisée à la concentration de 30 nM (Rodriguez *et al.*, 1994), deux substances aussi utilisées dans la différenciation adipogénique (Dani *et al.*, 1997). Ce sont peut-être ces substances qui sont à l'origine de la présence de cardiomyocytes dans les cultures adipogéniques P19. Le phénotype cardiomyogénique est révélé par les battements des cellules et l'expression de GATA4 et de la TpnI cardiaque. Dans les cultures adipogéniques, les colonies battantes ont la forme de myofibres alors que dans les cultures cardiomyogéniques « classique », elles forment des îlots. Il est possible que les myofibres soient formées par la fusion de cellules de muscle squelettique entre elles et/ou avec des cardiomyocytes puisque le DMSO et l'OT permettent l'obtention de ces deux types de cellules dans les cultures P19 (Skerjanc *et al.*, 1998; Danalache *et al.*, 2006) et que l'OTR fut retrouvé sur des myoblastes humains (Breton *et al.*, 2002). Des analyses immunocytochimiques de myoD et de la myogénine pourraient confirmer la génération de cellules de muscle squelettique. Des cellules battantes, sous forme de myofibres, ont aussi été obtenues avec le protocole ostéogénique appliqué aux P19 mais aucune cellule battante ne fut observée dans les différenciations adipogéniques des MSC.

L'hormone T3 est connue comme augmentant la différenciation et la fusion des myoblastes dans l'embryon du poulet (Marchal *et al.*, 1993; Marchal *et al.*, 1995). Si le niveau de T3 est trop faible, une diminution de la masse musculaire est observée chez le poulet en développement et serait due à une inhibition de l'expression de la chaîne lourde de la myosine (MHC), effet pouvant être renversé par l'ajout de T3 à l'embryon (Gardahaut *et al.*, 1992). La T3 semble aussi avoir des rôles à jouer dans la formation du cœur en stimulant la transcription de α -MHC et inhibant celle de β -MHC chez le rat et le lapin (Morkin, 1993) et en induisant la différenciation des cellules P19 en cardiomyocytes (Rodriguez *et al.*, 1994). Dans la différenciation des muscles squelettiques induite par T3, l'hormone thyroïdienne induit aussi la transcription de myoD suite à la formation d'un hétérodimère avec l'AR (Muscat *et al.*, 1994). L'organisation en myofibres des cellules battantes dérivées des P19 a été observée par une équipe de chercheurs utilisant le DMSO comme agent inducteur durant quatre jours d'agrégation (Angello *et al.*, 2006). Les résultats de cette équipe furent obtenus avec une lignée P19 variante, nommée P19-SI, qui ne nécessite pas la présence d'agent inducteur durant la période

d'agrégation; ils montrent que les myofibres sont polynucléaires et positives pour la myosine squelettique. L'utilisation du DMSO comme agent permettant d'obtenir des myofibres battantes montre que l'utilisation de T3 n'est pas essentielle à l'obtention de ce phénotype. Dans cette même optique, la différenciation des cellules P19 en ostéocytes, qui n'implique pas l'utilisation de T3, permet aussi l'obtention de cellules battantes qui ont la forme de myofibres. Il pourrait y avoir des colonies de cellules battantes sous forme d'îlots dans les cultures adipogéniques et ostéogéniques; ces colonies arrondies seraient difficiles à distinguer à cause de la relative abondance des myofibres battantes. Les phénotypes musculaires cardiaque et squelettique n'apparaissent pas au même moment dans les cultures P19; les cardiomyocytes apparaissent d'abord, puis les squelettomyocytes (Rudnicki et McBurney, 1987). Dans nos cultures adipogéniques, le contraire semble se produire. De grandes fibres similaires aux cellules de muscle squelettique apparaissent et, par la suite, ces fibres, ou des cardiomyocytes à proximité, montrent des battements. Les résultats présentés dans ce mémoire ont été effectués avec au moins six lots de cellules de CE P19 différents et il y a toujours eu génération de myofibres battantes, il ne s'agit pas ici d'une variante des cellules P19.

Dans les cultures du premier groupe (sérum inactivé à la chaleur, sections 3.1 à 3.3 inclusivement), l'ajout de 10^{-7} M d'OT au milieu de maturation adipogénique semble augmenter le nombre de cellules battantes (tableau 3.1). Comme pour les adipocytes, l'emploi d'OT durant la période d'induction en agrégation montre une forte diminution du nombre de cellules battantes (figure 3.1 et tableau 3.1). Pour les protocoles adipogéniques les plus performants quant au nombre de cellules battantes observées, l'analyse des marqueurs cardiaques GATA4 et TpnI cardiaque montre que l'ajout d'OT au milieu de maturation (Ins + T3) augmente de 2 à 4 fois la présence de ces ARNm dans les cultures (figure 3.5 et 3.6). L'OT, lorsqu'ajoutée au milieu de maturation, agit comme un facteur procadiomyogénique dans les différenciations mésodermiques, diminuant la différenciation adipogénique et ostéogénique, et soutenant la différenciation cardiomyogénique des cellules P19.

Dans les cultures adipogéniques, l'action anti-adipogénique de l'OT était bien démontrée par la réduction de la coloration à l'Oil-Red-O et par la baisse de l'expression de l'ARNm de PPAR γ . Par contre, l'expression de l'ARNm d'aP2, un autre marqueur adipogénique, n'a connu aucun changement (figure 3.2 et 3.3). La présence de cellules battantes dans la différenciation adipogénique des cellules P19 permet d'expliquer l'absence d'inhibition du transporteur lipidique aP2 dans les traitements avec l'OT (figure 3.3). Lors du développement néonatal du cœur, cet organe change son substrat énergétique, passant du glucose aux acides gras, et ceci entraîne ainsi une augmentation du niveau d'expression de certains gènes de marqueurs adipocytaires comme PPAR γ et le récepteur 2 à

l'adiponectine (Steinmetz *et al.*, 2005). D'autre part, le transporteur lipidique cardiaque (H-FABP) est aussi régulé à la hausse tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Tang *et al.*, 2004).

4.3 Comparaison du rendement cardiomyogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques

Les cellules souches embryonnaires génèrent des cardiomyocytes de façon spontanée lorsqu'elles sont cultivées en absence de LIF. Par contre, les cellules de CE P19 sont reconnues pour ne pas se différencier spontanément en cardiomyocytes et doivent être stimulées par un agent inducteur tel que l'AR, le DMSO (Rudnicki et McBurney, 1987) ou l'OT (Paquin *et al.*, 2002). Les résultats du deuxième groupe de cultures (sérum non inactivé à la chaleur, sections 3.4 et 3.5) vont à l'encontre de cela puisque les cultures P19 non-induites génèrent des cellules battantes en nombre relativement important comparativement aux cultures induites. La seule différence notable entre les deux groupes est le traitement du sérum, inactivé à la chaleur dans le premier groupe et non-inactivé dans le second groupe. La possibilité d'obtenir des cellules battantes en absence d'agent inducteur a été démontrée par l'équipe du Dr Hauschka et s'avère être sérum-dépendante puisque cette équipe a souligné avoir choisi un sérum permettant une prolifération rapide des cellules P19 en monocouches (Angello *et al.*, 2006). Cette information viendrait appuyer notre explication : un sérum non inactivé par la chaleur serait plus riche en protéines actives et favoriserait un plus haut taux de prolifération cellulaire. Les résultats de cytométrie de flux (figure 3.14) suggèrent aussi l'existence d'un potentiel de différenciation spontanée puisque 80% des cellules cultivées en agrégats pendant sept jours (NI) ont perdu l'antigène SSEA-1, il y a donc une majorité de cellules qui ont amorcé une différenciation, même en absence d'agent inducteur. Notre hypothèse que l'inactivation du sérum influence la différenciation demeure à être vérifiée, de même qu'il faudra tester l'effet de l'inactivation sur le rendement en cardiomyocytes en présence d'inducteur. Des études ont montré l'influence du sérum dans la différenciation cardiomyogénique de cellules souches. Par exemple, le nombre de colonies battantes augmente avec la diminution de la quantité de sérum dans le milieu de culture (Passier *et al.*, 2005). Cependant, l'influence d'une inactivation du sérum à la chaleur (laquelle détruit entre autre la cascade protéolytique du complément) n'a pas été rapportée et le présent travail soulève la possibilité que la non-inactivation soit propice à la différenciation des cellules P19 en cardiomyocytes.

Les résultats de ce travail montrent qu'en plus d'être cardiomyogénique dans l'étape d'induction lors de l'agrégation, OT aide à la maturation cardiomyogénique puisque les résultats de la figure 3.9A et B montrent une augmentation de l'apparition de cellules battantes lorsque l'OT est maintenue après la phase d'induction. Ces résultats ont été obtenus tant en utilisant le protocole de différenciation « classique » que par gouttes pendantes. Ce dernier permet d'ailleurs d'apercevoir des cellules

battantes plus rapidement, mais pas en plus grande quantité. L'effet cardiomyogénique d'OT durant la période de culture en adhésion s'avère être confirmé par une présence plus importante de l'ARNm de la TpnI cardiaque 20 jours suivant la période d'agrégation tant dans le protocole « classique » que en gouttes pendantes (voir figure 3.10). Parce qu'à la fin de la période d'agrégation en présence d'OT, il reste 20% de cellules positives pour SSEA-1 (figure 3.14), il est possible que ces cellules puissent générer des cardiomyocytes si l'OT demeure dans le milieu de culture post-agrégation. Alternativement, l'OT agit peut-être sur des cellules devenues SSEA-1⁻ mais pas encore engagées à devenir des cardiomyocytes. Cela pourrait être étudié en enlevant les cellules SSEA-1⁺ par MACS.

Les cellules battantes, sous la forme de myofibres, apparaissent tardivement durant la différenciation adipogénique, comme le montre la figure 3.9C, et l'ajout d'OT lors de la culture en adhésion permet d'observer des cellules battantes un peu plus rapidement, mais tout de même après celles obtenues dans les protocoles cardiomyogéniques (figure 3.9A et B). Comme dans le cas de l'OT, lorsque l'AR est utilisé durant la période d'agrégation, un petit nombre de cellules (7%) demeurent indifférenciées (figure 3.14). Contrairement aux études faites avec le sérum inactivé et qui montraient une augmentation de la TpnI cardiaque lorsque l'OT était combinée à l'Ins et la T3, les études faites avec le sérum non-inactivé ne montrent pas de changement dans l'expression de ce marqueur. Il se peut qu'une protéase inactivant protéolytiquement l'OT, comme l'ocytocinase, soit présente dans le sérum et dénaturée par l'inactivation à la chaleur. L'ocytocinase est une protéase stable à des températures variant entre -20°C et 4°C (Ikenaga *et al.*, 1993), mais on ne connaît pas sa résistance à des températures plus élevées. Le sérum peut aussi contenir des facteurs de croissance non nécessairement reliés à l'OT, mais qui sont affectés par la chaleur. Tout comme dans les différenciations cardiomyogéniques, l'absence d'agent inducteur et de maturation lors de la différenciation adipogénique permet l'observation de cellules battantes, mais cette fois-ci elles ont le phénotype d'îlots battants comme ceux observés dans les différenciations cardiaques (figure 3.9).

Les résultats de la figure 3.9 sont basés sur l'observation au microscope d'une plaque de 24 puits. Pour qu'un puits soit positif, la présence d'une seule cellule battante est nécessaire. Si l'observation entière des cultures est réalisée, la différenciation adipogénique en absence ou en présence d'OT semble avoir le plus haut pourcentage de cellules battantes, devant le protocole cardiaque « classique ». Ces résultats ne sont pas reflétés par l'analyse de l'ARNm de la TpnI cardiaque qui montre une plus grande expression de la TpnI dans les cultures en différenciation cardiomyogénique « classique » et en gouttes pendantes. Il est possible que la grande quantité de cellules battantes

observées dans la différenciation adipogénique soit due à un effet d'entraînement par les fibres contractiles sur les cellules avoisinantes.

Puisque la présence de l'ARNm n'implique pas nécessairement sa traduction en protéine, des expériences, bien que réalisées une seule fois, montrent la présence de la protéine TpnI dans les cultures en fin de différenciation cardiomyogénique et adipogénique (figure 3.3). Des études supplémentaires sur l'expression de la TpnI sont nécessaires pour déterminer les protocoles donnant le meilleur rendement en cardiomyocytes. Il est tout de même intéressant de remarquer la présence de la protéine dans les conditions adipogéniques, venant confirmer la présence de cardiomyocytes dans cette différenciation. On note une forte expression de la protéine TpnI dans les cellules P19 en propagation malgré l'absence de battements. Certains marqueurs de phénotypes cellulaires adultes sont retrouvés à la fois dans des cellules précurseurs et leurs dérivées différenciées. Ceci fut démontré par l'étude des cellules précurseurs de la crête neurale qui donnent naissance à plusieurs types cellulaires de la tête (e.g. mélanocytes, fibroblastes, neurones, myocytes). Ainsi, des cellules précurseurs individuelles expriment les marqueurs de trois et même quatre phénotypes cellulaires, mais certains marqueurs vont disparaître tout au long du processus de différenciation pour qu'il ne reste que les protéines d'un phénotype adulte donné (Trentin *et al.*, 2004). Des analyses subséquentes devront être faites avec un autre marqueur du phénotype cardiaque et qui serait non exprimé dans les cellules P19 indifférenciées.

4.4 Comparaison du rendement adipogénique des protocoles cardiomyogéniques et adipogéniques

La figure 3.12 montre que la présence d'inclusions lipidiques, caractéristique du phénotype adipocytaire, n'est obtenue qu'avec les cellules P19 soumises au protocole adipogénique en absence ou en présence d'OT et non aux protocoles cardiaques « classique » et en gouttes pendantes. Dans ces derniers cas, la coloration à l'Oil-Red-O était très faible, de l'ordre de celle observée dans les cultures non-induites. Les protocoles cardiomyogéniques ne sont donc pas propices à la formation d'adipocytes. L'inhibition de l'adipogenèse par l'ajout d'OT dans le milieu de maturation adipogénique n'est plus observée dans ces séries de différenciations faites avec un sérum différent non inactivé à la chaleur. La littérature ne mentionne pas l'importance du sérum dans la différenciation adipogénique des cellules souches embryonnaires et adultes, mais les résultats du présent travail soulignent la nécessité d'étudier l'effet de l'inactivation à la chaleur du sérum sur le potentiel de différenciation de l'OT.

4.5 Isolation des cardiomyocytes dans les cultures

Des chercheurs ont réussi à isoler, par un gradient de Percoll, des cardiomyocytes obtenus à partir de cellules souches embryonnaires et à les implanter de façon sous-cutanée sans y observer la formation de tératocarcinomes (E *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006). L'obtention de cellules battantes dans les cultures P19 tourne autour de 15% du nombre de cellules totales. Beaucoup de cellules demeurent indifférenciées et/ou se différencient en un type cellulaire autre que celui de cardiomyocyte. La différenciation adipogénique montre par contre un bon taux de différenciation en adipocytes, le peu de cellules ne répondant pas à la coloration à l'Oil-Red-O adopte majoritairement le phénotype de myofibres. Ces résultats permettent de croire qu'il serait possible d'isoler les cellules battantes obtenues avec le protocole adipogénique. À la fin de l'agrégation, les cultures peuvent être déplétées des cellules P19 indifférenciées par triage immunomagnétique dirigé contre SSEA-1, un marqueur de non-différenciation (Cui *et al.*, 2004). Des analyses préliminaires effectuées montrent qu'il est possible de retenir jusqu'à 4,5 millions des cellules P19 indifférenciées SSEA-1⁺ sur une colonne magnétique LS (figure 3.13). Par la suite, l'utilisation de l'OT, peut-être en combinaison avec un antagoniste de PPAR γ (Nakano *et al.*, 2006), diminuant le nombre d'adipocytes dans les cultures, permettra peut-être d'obtenir des cultures quasi-pures en cellules battantes. On peut aussi penser à dissocier les cultures adipogéniques à la fin de la période de maturation plutôt qu'à la fin de l'agrégation. Des essais de dissociation des cultures adipogéniques P19 avec la trypsine à la fin de la maturation (données non montrées) se sont avérés non concluants à cause de l'éclatement des cellules et une dissociation incomplète, mais l'utilisation de mélange d'hydrolases (e.g. trypsine + collagénase) pourrait permettre une meilleure dissociation.

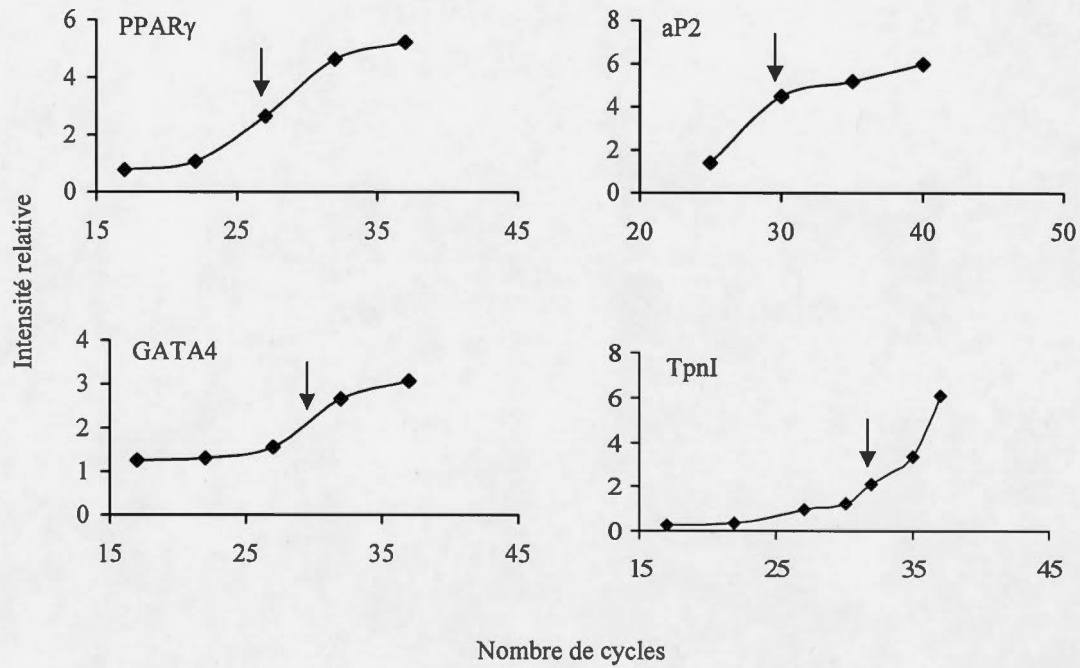
CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce mémoire indiquent qu'il est possible d'obtenir des adipocytes matures à partir des cellules de CE P19. En plus d'être positifs à la coloration à l'Oil-Red-O, les adipocytes P19 expriment l'ARNm de PPAR γ et d'aP2. L'ajout de 10^{-7} M d'OT au milieu de maturation de la différenciation adipogénique montre une baisse de 50% de la coloration à l'Oil-Red-O ainsi que des niveaux de l'ARNm de PPAR γ . L'OT a aussi un effet inhibiteur sur la différenciation des MSC en adipocytes et des cellules P19 en ostéocytes. Les cultures d'adipocytes montrent aussi la présence d'un autre phénotype mésodermique : des cellules musculaires battantes retrouvées sous la forme de myofibres et apparaissant plus tardivement que les adipocytes. Les cultures de cellules P19 en différenciation adipogénique sont positives pour deux ARNm marqueurs des cardiomyocytes, GATA4 et TpnI cardiaque. L'OT agit de façon à augmenter les ARNm de GATA4 et TpnI cardiaque si elle est ajoutée au milieu de maturation adipogénique des P19.

L'OT fut démontrée comme étant cardiomyogénique dans les cellules P19 lorsqu'utilisée comme facteur de différenciation durant la période d'agrégation (Paquin *et al.*, 2002). Dans cette étude, l'analyse de l'ARNm de la TpnI cardiaque pour comparer les rendements cardiomyogéniques des protocoles de différenciations cardiaques « classique » et en gouttes pendantes et du protocole adipogénique montre que les protocoles cardiaques avec présence d'OT dans le milieu de maturation en plus du milieu d'agrégation sont les plus performants.

De façon globale, l'OT pourrait avoir un rôle dans la régulation des phénotypes mésodermiques dans le développement. En accord avec cette proposition, l'expression de l'OT et de son récepteur a été rapportée dans des structures pré-embryonnaires et embryonnaires précoces (Furuya *et al.*, 1995). En culture, ce rôle serait influencé par le sérum. L'importance individuelle de l'AR, l'Ins et la T3 dans la balance adipogénique et cardiomyogénique demeure à être déterminée comme la possibilité d'augmenter l'action cardiomyogénique de l'OT. Des analyses quantitatives par immunodétection de type Western de marqueurs adipogéniques et cardiomyogéniques ainsi qu'une analyse en PCR en temps réel devront être effectuées afin de mieux quantifier l'effet de l'OT sur l'adipogénèse et la cardiomyogénèse.

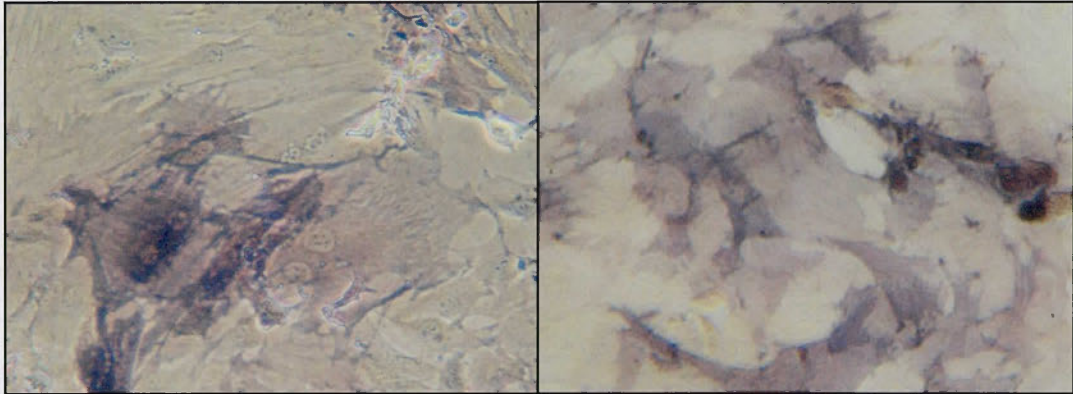
Appendice A



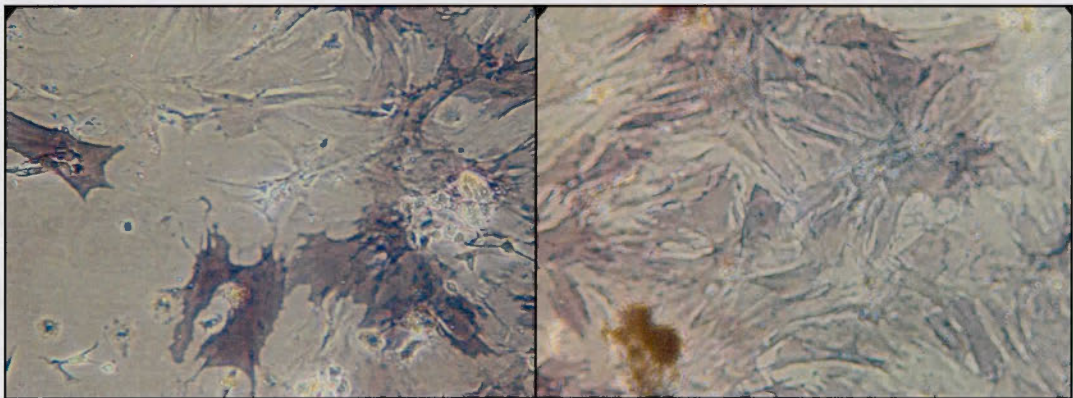
Courbe d'amplification des marqueurs utilisés pour les PCR. Les courbes ont été obtenues à partir d'expériences réalisées avec des cellules P19 en jour J7+20 de différenciation adipogénique, mélange 1 : 1 des conditions AR / Ins + T3 et AR / Ins + T3 + OT. Les échantillons furent tous soumis au même programme dans le thermocycleur sauf pour le nombre de cycles afin de déterminer la partie linéaire de la courbe d'amplification et d'y identifier (→) le nombre de cycles optimal pour les réactions de PCR.

Appendice B

A



B



Différenciation des MSC en ostéocytes. Coloration au bleu de tétrazolium de MSC au jour 28 de la différenciation ostéogénique réalisée en absence (A) ou en présence (B) de 10^{-7} M d'OT. Deux champs sont montrés par condition. Grossissement : 100X.

BIBLIOGRAPHIE

- Abderrahim-Ferkoune, A., Bezy, O., Astri-Roques, S., Elabd, C., Ailhaud, G. et Amri, E. Z. 2004. "Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein". *Exp Cell Res* 293(2): 219-28.
- Allen, M. 2006. "Pacemakers and implantable cardioverter defibrillators". *Anaesthesia* 61(9): 883-90.
- Allers, C., Sierralta, W. D., Neubauer, S., Rivera, F., Minguell, J. J. et Conget, P. A. 2004. "Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice". *Transplantation* 78(4): 503-8.
- Altstein, M. et Gainer, H. 1988. "Differential biosynthesis and posttranslational processing of vasopressin and oxytocin in rat brain during embryonic and postnatal development". *J Neurosci* 8(11): 3967-77.
- Andrews, P. W., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Damjanov, I., Gokhale, P. et Draper, J. S. 2005. "Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin". *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1526-30.
- Ang, V. T. et Jenkins, J. S. 1984. "Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla". *J Clin Endocrinol Metab* 58(4): 688-91.
- Angello, J. C., Kaestner, S., Welikson, R. E., Buskin, J. N. et Hauschka, S. D. 2006. "BMP induction of cardiogenesis in P19 cells requires prior cell-cell interaction(s)". *Dev Dyn* 235(8): 2122-33.
- Annabi, B., Lee, Y. T., Turcotte, S., Naud, E., Desrosiers, R. R., Champagne, M., Eliopoulos, N., Galipeau, J. et Beliveau, R. 2003. "Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation". *Stem Cells* 21(3): 337-47.
- Aouadi, M., Laurent, K., Prot, M., Le Marchand-Brustel, Y., Binetruy, B. et Bost, F. 2006. "Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages". *Diabetes* 55(2): 281-9.
- Argiolas, A., Melis, M. R., Stancampiano, R., Mauri, A. et Gessa, G. L. 1990. "Hypothalamic modulation of immunoreactive oxytocin in the rat thymus". *Peptides* 11(3): 539-43.
- Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L. et Gupta, A. K. 1995. "Osteoblast and chondroblast differentiation". *Bone* 17(2 Suppl): 77S-83S.
- Augert, G. et Exton, J. H. 1988. "Insulin and oxytocin effects on phosphoinositide metabolism in adipocytes". *J Biol Chem* 263(8): 3600-9.
- Ausoni, S., Campione, M., Picard, A., Moretti, P., Vitadello, M., De Nardi, C. et Schiaffino, S. 1994. "Structure and regulation of the mouse cardiac troponin I gene". *J Biol Chem* 269(1): 339-46.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E. et Gottlieb, D. I. 1995. "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro". *Dev Biol* 168(2): 342-57.
- Baksh, D., Song, L. et Tuan, R. S. 2004. "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy". *J Cell Mol Med* 8(3): 301-16.
- Bani-Yaghoub, M., Kendall, S. E., Moore, D. P., Bellum, S., Cowling, R. A., Nikopoulos, G. N., Kubu, C. J., Vary, C. et Verdi, J. M. 2004. "Insulin acts as a myogenic differentiation signal for neural stem cells with multilineage differentiation potential". *Development* 131(17): 4287-98.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B. et Anversa, P. 2003. "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration". *Cell* 114(6): 763-76.
- Boer, P. H. 1994. "Activation of the gene for type-b natriuretic factor in mouse stem cell cultures induced for cardiac myogenesis". *Biochem Biophys Res Commun* 199(2): 954-61.
- Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V. et Wobus, A. M. 2002. "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes". *Circ Res* 91(3): 189-201.

- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L. et Binetruy, B. 2005. "The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity". *Biochimie* 87(1): 51-6.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y. et Binetruy, B. 2002. "Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage". *Biochem J* 361(Pt 3): 621-7.
- Boudjelal, M., Taneja, R., Matsubara, S., Bouillet, P., Dolle, P. et Chambon, P. 1997. "Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells". *Genes Dev* 11(16): 2052-65.
- Breton, C., Haenggeli, C., Barberis, C., Heitz, F., Bader, C. R., Bernheim, L. et Tribollet, E. 2002. "Presence of functional oxytocin receptors in cultured human myoblasts". *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1415-8.
- Bruder, S. P., Jaiswal, N. et Haynesworth, S. E. 1997. "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation". *J Cell Biochem* 64(2): 278-94.
- Brun, R. P., Tontonoz, P., Forman, B. M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R. M. et Spiegelman, B. M. 1996. "Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms". *Genes Dev* 10(8): 974-84.
- Buttery, L. D., Bourne, S., Xynos, J. D., Wood, H., Hughes, F. J., Hughes, S. P., Episkopou, V. et Polak, J. M. 2001. "Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells". *Tissue Eng* 7(1): 89-99.
- Cadet, N. et Paquin, J. 2000. "Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons". *Brain Res Dev Brain Res* 120(2): 211-21.
- Caplan, A. I. 1991. "Mesenchymal stem cells". *J Orthop Res* 9(5): 641-50.
- Caplan, A. I. et Bruder, S. P. 2001. "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century". *Trends Mol Med* 7(6): 259-64.
- Chang, T. H. et Polakis, S. E. 1978. "Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors". *J Biol Chem* 253(13): 4693-6.
- Chiu, F. C., Feng, L., Chan, S. O., Padin, C. et Federoff, J. H. 1995. "Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells". *Brain Res Mol Brain Res* 30(1): 77-86.
- Chmurzynska, A. 2006. "The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism". *J Appl Genet* 47(1): 39-48.
- Choi, S. C., Yoon, J., Shim, W. J., Ro, Y. M. et Lim, D. S. 2004. "5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells". *Exp Mol Med* 36(6): 515-23.
- Copland, J. A., Ives, K. L., Simmons, D. J. et Soloff, M. S. 1999. "Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts". *Endocrinology* 140(9): 4371-4.
- Cui, L., Johkura, K., Yue, F., Ogiwara, N., Okouchi, Y., Asanuma, K. et Sasaki, K. 2004. "Spatial distribution and initial changes of SSEA-1 and other cell adhesion-related molecules on mouse embryonic stem cells before and during differentiation". *J Histochem Cytochem* 52(11): 1447-57.
- Danalache, B. A., Paquin, J., Wang, D., Grygorczyk, R., Moore, J. C., Mummery, C. L., Gutkowska, J. et Jankowski, M. 2006. "Nitric Oxide Signaling in Oxytocin-mediated Cardiomyogenesis". *Stem Cells*.
- Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A. et Lowik, C. W. 2003. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein". *J Biol Chem* 278(2): 962-7.
- Dani, C. 1999. "Embryonic stem cell-derived adipogenesis". *Cells Tissues Organs* 165(3-4): 173-80.
- Dani, C., Smith, A. G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C. et Ailhaud, G. 1997. "Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro". *J Cell Sci* 110 (Pt 11): 1279-85.

- de Geest, K., Thiery, M., Piron-Possuyt, G. et Vanden Driessche, R. 1985. "Plasma oxytocin in human pregnancy and parturition". *J Perinat Med* 13(1): 3-13.
- Deans, R. J. et Moseley, A. B. 2000. "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses". *Exp Hematol* 28(8): 875-84.
- den Hertog, C. E., de Groot, A. N. et van Dongen, P. W. 2001. "History and use of oxytocics". *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94(1): 8-12.
- Doevendans, P. A., Kubalak, S. W., An, R. H., Becker, D. K., Chien, K. R. et Kass, R. S. 2000. "Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol* 32(5): 839-51.
- Dogterom, J., Van Wimersma Greidanus, T. B. et Swabb, D. F. 1977. "Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats". *Neuroendocrinology* 24(2): 108-18.
- Du Vigneaud, V., Ressler, C. et Trippett, S. 1953. "The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin". *J Biol Chem* 205(2): 949-57.
- E, L. L., Zhao, Y. S., Guo, X. M., Wang, C. Y., Jiang, H., Li, J., Duan, C. M. et Song, Y. 2006. "Enrichment of cardiomyocytes derived from mouse embryonic stem cells". *J Heart Lung Transplant* 25(6): 664-74.
- Edwards, M. K. et McBurney, M. W. 1983. "The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line". *Dev Biol* 98(1): 187-91.
- Egan, J. J., Saltis, J., Wek, S. A., Simpson, I. A. et Londos, C. 1990. "Insulin, oxytocin, and vasopressin stimulate protein kinase C activity in adipocyte plasma membranes". *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(3): 1052-6.
- Enarsson, M., Erlandsson, A., Larsson, H. et Forsberg-Nilsson, K. 2002. "Extracellular signal-regulated protein kinase signaling is uncoupled from initial differentiation of central nervous system stem cells to neurons". *Mol Cancer Res* 1(2): 147-54.
- Fabian, E., Havranek, F., Stork, A. et Sponarova, J. 1969. "[Changes of some indicators of lipid metabolism following short term administration of Biogest to fertile non-pregnant women and in the 1st trimester of pregnancy]". *Cas Lek Cesk* 108(49): 1466-9.
- Favaretto, A. L., Ballejo, G. O., Albuquerque-Araujo, W. I., Gutkowska, J., Antunes-Rodrigues, J. et McCann, S. M. 1997. "Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action". *Peptides* 18(9): 1377-81.
- Field, S. J., Johnson, R. S., Mortensen, R. M., Papaioannou, V. E., Spiegelman, B. M. et Greenberg, M. E. 1992. "Growth and differentiation of embryonic stem cells that lack an intact c-fos gene". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19): 9306-10.
- Fuchs, A. R., Fuchs, F., Husslein, P. et Soloff, M. S. 1984. "Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition". *Am J Obstet Gynecol* 150(6): 734-41.
- Fugate, J. H. 2006. "Pharmacologic management of cardiac emergencies". *J Infus Nurs* 29(3): 147-50.
- Furuya, K., Mizumoto, Y., Makimura, N., Mitsui, C., Murakami, M., Tokuoka, S., Ishikawa, N., Nagata, I., Kimura, T. et Ivell, R. 1995. "A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes". *Adv Exp Med Biol* 395: 523-8.
- Gardahaut, M. F., Fontaine-Perus, J., Rouaud, T., Bandman, E. et Ferrand, R. 1992. "Developmental modulation of myosin expression by thyroid hormone in avian skeletal muscle". *Development* 115(4): 1121-31.
- Gauquelin, G., Gharib, C., Ghaemmaghami, F., Allevard, A. M., Cherbal, F., Geelen, G., Bouzeghrane, F. et Legros, J. J. 1988. "A day/night rhythm of vasopressin and oxytocin in rat retina, pineal and hardierian gland". *Peptides* 9(2): 289-93.
- Gaustad, K. G., Boquest, A. C., Anderson, B. E., Gerdes, A. M. et Collas, P. 2004. "Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes". *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 420-7.

- Gimpl, G. et Fahrenholz, F. 2001. "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation". *Physiol Rev* 81(2): 629-83.
- Green, H. et Kehinde, O. 1975. "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion". *Cell* 5(1): 19-27.
- Green, H. et Meuth, M. 1974. "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture". *Cell* 3(2): 127-33.
- Grepin, C., Nemer, G. et Nemer, M. 1997. "Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor". *Development* 124(12): 2387-95.
- Guo, X. M., Zhao, Y. S., Chang, H. X., Wang, C. Y., E, L. L., Zhang, X. A., Duan, C. M., Dong, L. Z., Jiang, H., Li, J., Song, Y. et Yang, X. J. 2006. "Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells". *Circulation* 113(18): 2229-37.
- Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H. H. et McCann, S. M. 1997. "Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11704-9.
- Guzzi, F., Zanchetta, D., Cassoni, P., Guzzi, V., Francolini, M., Parenti, M. et Chini, B. 2002. "Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response". *Oncogene* 21(11): 1658-67.
- Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P. J., Meacham, A. M., Zon, L. I. et Terada, N. 2001. "Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro". *FEBS Lett* 497(1): 15-9.
- Hammock, E. A. et Young, L. J. 2006. "Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1476): 2187-98.
- Hanif, K., Lederis, K., Hollenberg, M. D. et Goren, H. J. 1982. "Inability of oxytocin to activate pyruvate dehydrogenase in the Brattleboro rat". *Science* 216(4549): 1010-2.
- Harmancey, R., Senard, J. M., Pathak, A., Desmoulin, F., Claparols, C., Rouet, P. et Smih, F. 2005. "The vasoactive peptide adrenomedullin is secreted by adipocytes and inhibits lipolysis through NO-mediated beta-adrenergic agonist oxidation". *Faseb J* 19(8): 1045-7.
- Harmon, A. W. et Harp, J. B. 2001. "Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis". *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4): C807-13.
- Heino, T. J., Hentunen, T. A. et Vaananen, H. K. 2004. "Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts". *Exp Cell Res* 294(2): 458-68.
- Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lentini, S., Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Wobus, A. M. et Addicks, K. 1997. "Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis". *Cardiovasc Res* 36(2): 149-62.
- Hollander, E., Novotny, S., Hanratty, M., Yaffe, R., DeCaria, C. M., Aronowitz, B. R. et Mosovich, S. 2003. "Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders". *Neuropsychopharmacology* 28(1): 193-8.
- Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Papaioannou, V. E. et Spiegelman, B. M. 1996. "Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein". *Science* 274(5291): 1377-9.
- Hwang, J. T., Park, I. J., Shin, J. I., Lee, Y. K., Lee, S. K., Baik, H. W., Ha, J. et Park, O. J. 2005. "Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase". *Biochem Biophys Res Commun* 338(2): 694-9.
- Ikenaga, H., Mizuta, Y., Ono, K., Sawazaki, T., Suzuki, N. et Tomoda, I. 1993. "Placental and plasma cystine aminopeptidase in pregnant animals". *J Vet Med Sci* 55(3): 479-80.
- Insel, T. R. 1997. "A neurobiological basis of social attachment". *Am J Psychiatry* 154(6): 726-35.
- Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Yoda-Murakami, M., Choi-Miura, N. H., Tomita, M., Ito, K., Zhang, L., Akishima, Y., Ishihara, M., Muramatsu, M. et Taniyama, M. 2003. "Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury". *Histopathology* 42(1): 43-52.

- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. et Bruder, S. P. 1997. "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro". *J Cell Biochem* 64(2): 295-312.
- Jankowski, M., Hajjar, F., Kawas, S. A., Mukaddam-Daher, S., Hoffman, G., McCann, S. M. et Gutkowska, J. 1998. "Rat heart: a site of oxytocin production and action". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24): 14558-63.
- Jensen, B., Farach-Carson, M. C., Kenaley, E. et Akanbi, K. A. 2004. "High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes". *Exp Cell Res* 301(2): 280-92.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. et Yoo, J. U. 1998. "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells". *Exp Cell Res* 238(1): 265-72.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C. A. et Anversa, P. 1998. "Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans". *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8801-5.
- Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., Kosaki, A., Shintani, S., Murohara, T., Imaizumi, T. et Iwasaka, T. 2001. "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines". *Circulation* 104(9): 1046-52.
- Kanno, S., Kim, P. K., Sallam, K., Lei, J., Billiar, T. R. et Shears, L. L., 2nd 2004. "Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(33): 12277-81.
- Kawaguchi, J., Mee, P. J. et Smith, A. G. 2005. "Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors". *Bone* 36(5): 758-69.
- Kawamoto, A., Gwon, H. C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J. I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. M. et Asahara, T. 2001. "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia". *Circulation* 103(5): 634-7.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. et Gepstein, L. 2001. "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes". *J Clin Invest* 108(3): 407-14.
- Keller, G. 2005. "Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine". *Genes Dev* 19(10): 1129-55.
- Kessler, P. D. et Byrne, B. J. 1999. "Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications". *Annu Rev Physiol* 61: 219-42.
- Kim, K. H., Song, M. J., Chung, J., Park, H. et Kim, J. B. 2005. "Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner". *Biochem Biophys Res Commun* 333(4): 1178-84.
- Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., Katoh, T., Kobayashi, S., Matsuzaki, M. et Esato, K. 2000. "Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model". *J Surg Res* 89(2): 189-95.
- Koh, G. Y., Soonpaa, M. H., Klug, M. G. et Field, L. J. 1993. "Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium". *Am J Physiol* 264(5 Pt 2): H1727-33.
- Koh, G. Y., Soonpaa, M. H., Klug, M. G., Pride, H. P., Cooper, B. J., Zipes, D. P. et Field, L. J. 1995. "Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs". *J Clin Invest* 96(4): 2034-42.
- Kramer, J., Hegert, C., Guan, K., Wobus, A. M., Muller, P. K. et Rohwedel, J. 2000. "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4". *Mech Dev* 92(2): 193-205.
- Lange, C., Schroeder, J., Stute, N., Lioznov, M. V. et Zander, A. R. 2005. "High-potential human mesenchymal stem cells". *Stem Cells Dev* 14(1): 70-80.

- Le Moigne, A. et Foucrier, J. (2001). *Biologie du développement*. Paris, Dunod.
- Lefebvre, D. L., Giaid, A., Bennett, H., Larivière, R. et Zingg, H. H. 1992. "Oxytocin gene expression in rat uterus". *Science* 256(5063): 1553-5.
- Lefebvre, D. L., Giaid, A. et Zingg, H. H. 1992. "Expression of the oxytocin gene in rat placenta". *Endocrinology* 130(3): 1185-92.
- Lennon, D. P., Edmison, J. M. et Caplan, A. I. 2001. "Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis". *J Cell Physiol* 187(3): 345-55.
- Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Young, R. G., Dennis, J. E. et Caplan, A. I. 1995. "A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells". *Exp Cell Res* 219(1): 211-22.
- Li, M. X., Wang, X. et Sykes, B. D. 2004. "Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology". *J Muscle Res Cell Motil* 25(7): 559-79.
- Lin, J., Della-Fera, M. A. et Baile, C. A. 2005. "Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes". *Obes Res* 13(6): 982-90.
- Litherland, G. J., Hajdich, E. et Hundal, H. S. 2001. "Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review)". *Mol Membr Biol* 18(3): 195-204.
- Lowell, B. B. 1999. "PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function". *Cell* 99(3): 239-42.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. et McKay, R. 2001. "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets". *Science* 292(5520): 1389-94.
- MacPherson, P. A. et McBurney, M. W. 1995. "P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultures neurons amenable to genetic manipulation." *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 7: 238-252.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. et Ogawa, S. 1999. "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro". *J Clin Invest* 103(5): 697-705.
- Mansen, A., Guardiola-Diaz, H., Rafter, J., Branting, C. et Gustafsson, J. A. 1996. "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa". *Biochem Biophys Res Commun* 222(3): 844-51.
- Marani, E., van Oers, J. W., Tetteroo, P. A., Poelmann, R. E., van der Veen, J. et Deenen, M. G. 1986. "Stage specific embryonic carbohydrate surface antigens of primordial germ cells in mouse embryos: FAL (S.S.E.A.-1) and globoside (S.S.E.A.-3)". *Acta Morphol Neerl Scand* 24(2): 103-10.
- Marchal, S., Cassar-Malek, I., Magaud, J. P., Rouault, J. P., Wrutniak, C. et Cabello, G. 1995. "Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway". *Exp Cell Res* 220(1): 1-10.
- Marchal, S., Cassar-Malek, I., Pons, F., Wrutniak, C. et Cabello, G. 1993. "Triiodothyronine influences quail myoblast proliferation and differentiation". *Biol Cell* 78(3): 191-7.
- Marom, R., Shur, I., Solomon, R. et Benayahu, D. 2005. "Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells". *J Cell Physiol* 202(1): 41-8.
- Matsubara, T., Tsutsumi, S., Pan, H., Hiraoka, H., Oda, R., Nishimura, M., Kawaguchi, H., Nakamura, K. et Kato, Y. 2004. "A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix". *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 503-8.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H. et Komuro, I. 2004. "Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes". *J Biol Chem* 279(12): 11384-91.
- McBurney, M. W. 1993. "P19 embryonal carcinoma cells". *Int J Dev Biol* 37(1): 135-40.
- McBurney, M. W., Costa, S. et Pratt, M. A. 1993. "Retinoids and cancer: a basis for differentiation therapy". *Cancer Invest* 11(5): 590-8.

- Mena, F., Pacheco, P., Aguayo, D., Clapp, C. et Grosvenor, C. E. 1978. "A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of mammary nerve in anesthetized rats". *Endocrinology* 103(5): 1929-36.
- Michellini, L. C., Marcelo, M. C., Amico, J. et Morris, M. 2003. "Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(6): H2269-76.
- Miki, H., Yamauchi, T., Suzuki, R., Komeda, K., Tsuchida, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Kamon, J., Kaburagi, Y., Matsui, J., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tobe, K. et Kadowaki, T. 2001. "Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation". *Mol Cell Biol* 21(7): 2521-32.
- Mirsky, I. A. et Perisutti, G. 1962. "Action of oxytocin and related peptides on epididymal adipose tissue of the rat". *Endocrinology* 71: 158-63.
- Mitchell, B. F., Fang, X. et Wong, S. 1998. "Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition?" *Rev Reprod* 3(2): 113-22.
- Mitchell, B. F., Fang, X. et Wong, S. 1998. "Role of carboxy-extended forms of oxytocin in the rat uterus in the process of parturition". *Biol Reprod* 59(6): 1321-7.
- Molkentin, J. D., Kalvakolanu, D. V. et Markham, B. E. 1994. "Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene". *Mol Cell Biol* 14(7): 4947-57.
- Moon, S. Y., Park, Y. B., Kim, D. S., Oh, S. K. et Kim, D. W. 2006. "Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications". *Mol Ther* 13(1): 5-14.
- Morkin, E. 1993. "Regulation of myosin heavy chain genes in the heart". *Circulation* 87(5): 1451-60.
- Morley, P. et Whitfield, J. F. 1993. "The differentiation inducer, dimethyl sulfoxide, transiently increases the intracellular calcium ion concentration in various cell types". *J Cell Physiol* 156(2): 219-25.
- Mukaddam-Daher, S., Yin, Y. L., Roy, J., Gutkowska, J. et Cardinal, R. 2001. "Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin". *Hypertension* 38(2): 292-6.
- Murray, T. et Russell, T. R. 1980. "Inhibition of adipose conversion in 3T3-L2 cells by retinoic acid". *J Supramol Struct* 14(2): 255-66.
- Muscat, G. E., Mynett-Johnson, L., Dowhan, D., Downes, M. et Griggs, R. 1994. "Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors". *Nucleic Acids Res* 22(4): 583-91.
- Nakano, R., Kurosaki, E., Yoshida, S., Yokono, M., Shimaya, A., Maruyama, T. et Shibasaki, M. 2006. "Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma prevents high-fat diet-induced obesity in vivo". *Biochem Pharmacol* 72(1): 42-52.
- Nishimori, K. et Matzuk, M. M. 1996. "Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function". *Rev Reprod* 1(3): 203-12.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A. C., Segal, M. et McKay, R. D. 1996. "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro". *Mech Dev* 59(1): 89-102.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. et Anversa, P. 2001. "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium". *Nature* 410(6829): 701-5.
- Paquin, J., Aouffen, M., De Grandpre, E., Nadeau, R., Langlois, D. et Mateescu, M. A. 2005. "Neuroprotective and cardioprotective actions of an association of pyruvate, vitamin E and fatty acids". *Arzneimittelforschung* 55(7): 359-69.
- Paquin, J., Danalache, B. A., Jankowski, M., McCann, S. M. et Gutkowska, J. 2002. "Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes". *Proc Natl Acad Sci USA* 99(14): 9550-5.

- Parmacek, M. S. et Leiden, J. M. 1989. "Structure and expression of the murine slow/cardiac troponin C gene". *J Biol Chem* 264(22): 13217-25.
- Passier, R., Oostwaard, D. W., Snapper, J., Kloots, J., Hassink, R. J., Kuijk, E., Roelen, B., de la Riviere, A. B. et Mummery, C. 2005. "Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures". *Stem Cells* 23(6): 772-80.
- Pequeux, C., Keegan, B. P., Hagelstein, M. T., Geenen, V., Legros, J. J. et North, W. G. 2004. "Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway". *Endocr Relat Cancer* 11(4): 871-85.
- Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Mesquita, C. T., Rossi, M. I., Carvalho, A. C., Dutra, H. S., Dohmann, H. J., Silva, G. V., Belem, L., Vivacqua, R., Rangel, F. O., Esporcatte, R., Geng, Y. J., Vaughn, W. K., Assad, J. A., Mesquita, E. T. et Willerson, J. T. 2003. "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure". *Circulation* 107(18): 2294-302.
- Piersma, A. H., Ploemacher, R. E. et Brockbank, K. G. 1983. "Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route". *Br J Haematol* 54(2): 285-90.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. et Marshak, D. R. 1999. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science* 284(5411): 143-7.
- Potter, J. D., Sheng, Z., Pan, B. S. et Zhao, J. 1995. "A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction". *J Biol Chem* 270(6): 2557-62.
- Rimoldi, V., Reversi, A., Taverna, E., Rosa, P., Francolini, M., Cassoni, P., Parenti, M. et Chini, B. 2003. "Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains". *Oncogene* 22(38): 6054-60.
- Ringe, J., Kaps, C., Burmester, G. R. et Sitterling, M. 2002. "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs". *Naturwissenschaften* 89(8): 338-51.
- Rodriguez, E. R., Tan, C. D., Onwuta, U. S., Yu, Z. X., Ferrans, V. J. et Parrillo, J. E. 1994. "3,5,3'-Triiodo-L-thyronine induces cardiac myocyte differentiation but not neuronal differentiation in P19 teratocarcinoma cells in a dose dependent manner". *Biochem Biophys Res Commun* 205(1): 652-8.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J. et Wobus, A. M. 1994. "Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents". *Dev Biol* 164(1): 87-101.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M. et Mortensen, R. M. 1999. "PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro". *Mol Cell* 4(4): 611-7.
- Rudnicki, M. A. et McBurney, M. W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. Dans Teratocarcinomas and embryonic stem cells : a practical approach. Oxford, IRL.
- Russell, T. R. et Ho, R. 1976. "Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F₂alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine". *Proc Natl Acad Sci USA* 73(12): 4516-20.
- Sekiya, I., Larson, B. L., Smith, J. R., Pochampally, R., Cui, J. G. et Prockop, D. J. 2002. "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality". *Stem Cells* 20(6): 530-41.
- Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D. R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N. et Walsh, K. 2005. "Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms". *Nat Med* 11(10): 1096-103.

- Skerjanc, I. S., Petropoulos, H., Ridgeway, A. G. et Wilton, S. 1998. "Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells". *J Biol Chem* 273(52): 34904-10.
- Solter, D. et Knowles, B. B. 1978. "Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)". *Proc Natl Acad Sci USA* 75(11): 5565-9.
- Sordella, R., Jiang, W., Chen, G. C., Curto, M. et Settleman, J. 2003. "Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis". *Cell* 113(2): 147-58.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M. et Steinhoff, G. 2003. "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration". *Lancet* 361(9351): 45-6.
- Steinmetz, M., Quentin, T., Poppe, A., Paul, T. et Jux, C. 2005. "Changes in expression levels of genes involved in fatty acid metabolism: upregulation of all three members of the PPAR family (alpha, gamma, delta) and the newly described adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1 during neonatal cardiac development of the rat". *Basic Res Cardiol* 100(3): 263-9.
- Sterchele, P. F., Sun, H., Peterson, R. E. et Vanden Heuvel, J. P. 1996. "Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mRNA in rat liver". *Arch Biochem Biophys* 326(2): 281-9.
- Strakova, Z., Copland, J. A., Lolait, S. J. et Soloff, M. S. 1998. "ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis". *Am J Physiol* 274(4 Pt 1): E634-41.
- Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kosterling, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G. et Wernet, P. 2002. "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans". *Circulation* 106(15): 1913-8.
- Sun, B., Zhang, S., Ni, C., Zhang, D., Liu, Y., Zhang, W., Zhao, X., Zhao, C. et Shi, M. 2005. "Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow". *Stem Cells Dev* 14(3): 292-8.
- Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P. C., Fryer, R. M., Sarang, S. S., Gullans, S. R. et Lee, R. T. 2003. "Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes". *Circulation* 107(14): 1912-6.
- Tang, M. K., Kindler, P. M., Cai, D. Q., Chow, P. H., Li, M. et Lee, K. K. 2004. "Heart-type fatty acid binding proteins are upregulated during terminal differentiation of mouse cardiomyocytes, as revealed by proteomic analysis". *Cell Tissue Res* 316(3): 339-47.
- Taylor, D. A., Atkins, B. Z., Hungspreugs, P., Jones, T. R., Reedy, M. C., Hutcheson, K. A., Glower, D. D. et Kraus, W. E. 1998. "Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation". *Nat Med* 4(8): 929-33.
- Taylor, S. M. et Jones, P. A. 1979. "Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine". *Cell* 17(4): 771-9.
- Tetteroo, F., De Bruijn, A. Y., Henselmans, R., Wolkers, W. F., Van Aelst, A. C. et Hoekstra, F. A. 1996. "Characterization of Membrane Properties in Desiccation-Tolerant and -Intolerant Carrot Somatic Embryos". *Plant Physiol* 111(2): 403-412.
- Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J. et Kessler, P. D. 2002. "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart". *Circulation* 105(1): 93-8.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. et Miller, F. D. 2001. "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin". *Nat Cell Biol* 3(9): 778-84.
- Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N. M. et Dupin, E. 2004. "Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 101(13): 4495-500.
- Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L. et Lau, C. P. 2003. "Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation". *Lancet* 361(9351): 47-9.

- Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S. et Yamamura, H. 2001. "Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells". *FEBS Lett* 489(2-3): 129-33.
- Tuch, B. E. 2006. "Stem cells--a clinical update". *Aust Fam Physician* 35(9): 719-21.
- Udani, V., Santarelli, J., Yung, Y., Cheshier, S., Andrews, A., Kasad, Z. et Tse, V. 2005. "Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 may enhance recruitment of bone-marrow-derived endothelial precursor cells into brain tumors". *Neurol Res* 27(8): 801-6.
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M. et Hu, W. S. 2005. "Culture systems for pluripotent stem cells". *J Biosci Bioeng* 100(1): 12-27.
- Veerkamp, J. H. et Maatman, R. G. 1995. "Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes". *Prog Lipid Res* 34(1): 17-52.
- Ventura, C. et Maioli, M. 2000. "Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells". *Circ Res* 87(3): 189-94.
- Wagner, K. U., Young, W. S., 3rd, Liu, X., Ginns, E. I., Li, M., Furth, P. A. et Hennighausen, L. 1997. "Oxytocin and milk removal are required for post-partum mammary-gland development". *Genes Funct* 1(4): 233-44.
- Wakitani, S., Saito, T. et Caplan, A. I. 1995. "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine". *Muscle Nerve* 18(12): 1417-26.
- Wang, J. S., Shum-Tim, D., Galipeau, J., Chedrawy, E., Eliopoulos, N. et Chiu, R. C. 2000. "Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages". *J Thorac Cardiovasc Surg* 120(5): 999-1005.
- Wang, T., Xu, Z., Jiang, W. et Ma, A. 2006. "Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell". *Int J Cardiol* 109(1): 74-81.
- Wilson, E. J. et Hollenberg, M. D. 1987. "Effects of oxytocin and vasopressin on the preadipocyte 3T3-F442A cell line". *Biochem Cell Biol* 65(3): 211-8.
- Winslow, J. T. et Insel, T. R. 2002. "The social deficits of the oxytocin knockout mouse". *Neuropeptides* 36(2-3): 221-9.
- Wobus, A. M., Kaomei, G., Shan, J., Wellner, M. C., Rohwedel, J., Ji, G., Fleischmann, B., Katus, H. A., Hescheler, J. et Franz, W. M. 1997. "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol* 29(6): 1525-39.
- Wobus, A. M., Kleppisch, T., Maltsev, V. et Hescheler, J. 1994. "Cardiomyocyte-like cells differentiated in vitro from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca²⁺ channels". *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A(7): 425-34.
- Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. et Drexler, H. 2004. "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial". *Lancet* 364(9429): 141-8.
- Wu, S., Jia, M., Ruan, Y., Liu, J., Guo, Y., Shuang, M., Gong, X., Zhang, Y., Yang, X. et Zhang, D. 2005. "Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population". *Biol Psychiatry* 58(1): 74-7.
- Wu, W. X., Verbalis, J. G., Hoffman, G. E., Derks, J. B. et Nathanielsz, P. W. 1996. "Characterization of oxytocin receptor expression and distribution in the pregnant sheep uterus". *Endocrinology* 137(2): 722-8.
- Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H. et Chen, Y. 2004. "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro". *Exp Biol Med (Maywood)* 229(7): 623-31.
- Yamashita, A., Takada, T., Nemoto, K., Yamamoto, G. et Torii, R. 2006. "Transient suppression of PPARgamma directed ES cells into an osteoblastic lineage". *FEBS Lett* 580(17): 4121-5.

- Yoon, J., Min, B. G., Kim, Y. H., Shim, W. J., Ro, Y. M. et Lim, D. S. 2005. "Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model". *Acta Cardiol* 60(3): 277-84.
- Young, W. S., 3rd, Shepard, E., DeVries, A. C., Zimmer, A., LaMarca, M. E., Ginns, E. I., Amico, J., Nelson, R. J., Hennighausen, L. et Wagner, K. U. 1998. "Targeted reduction of oxytocin expression provides insights into its physiological roles". *Adv Exp Med Biol* 449: 231-40.
- Yun, Z., Maecker, H. L., Johnson, R. S. et Giaccia, A. J. 2002. "Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia". *Dev Cell* 2(3): 331-41.
- Zhang, W., Zhao, L., Lin, T. R., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I. et Mulholland, M. W. 2004. "Inhibition of adipogenesis by ghrelin". *Mol Biol Cell* 15(5): 2484-91.
- Zimmermann, W. H., Didie, M., Doker, S., Melnychenko, I., Naito, H., Rogge, C., Tiburcy, M. et Eschenhagen, T. 2006. "Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy". *Cardiovasc Res* 71(3): 419-29.
- zur Nieden, N. I., Kempka, G. et Ahr, H. J. 2003. "In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts". *Differentiation* 71(1): 18-27.